

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 Штампа-Print

ISSN 2303-4475 Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ



Veterinary Journal of Republic of Srpska

Волумен/Volumen XXIV, бр./No 1-2, стр./page 01-255, Бања Лука/Banja Luka, 2024



1934 - 2024

90 ГОДИНА ВЕТЕРИНАРСКОГ ИНСТИТУТА РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ
90TH ANNIVERSARY OF THE VETERINARY INSTITUTE OF THE REPUBLIC OF SRPSKA

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887-Штампа-Print
ISSN 2303-4475 - Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ
VETERINARY JOURNAL OF REPUBLIC OF SRPSKA
Научни часопис – Scientific journal

Ветеринарски журнал Републике Српске, Вол. 24, број 1-2, стр. 1-255, Бања Лука, 2024
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XXIV, No 1-2, page 1-255, Banja Luka, 2024

ИЗДАВАЧ – PUBLISHER:

ЈУ ВЕТЕРИНАРСКИ ИНСТИТУТ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ „Др Васо Бутозан“ БАЊА ЛУКА
PI VETERINARY INSTITUTE REPUBLIC OF SRPSKA „Dr. Vaso Butozan“ BANJA LUKA

ГЛАВНИ УРЕДНИК – EDITOR IN CHIEF:

Проф. др Драго Н. Недић, Prof.dr. Drago N. Nedici (БиХ-РС, В&Н-RS)

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР – INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD:

Др Милорад Мириловић, Dr Milorad Mirilović, PhD, (Србија-Serbia)

Др Жељко Цветнић, Dr Željko Cvetnić, PhD, (Хрватска-Croatia)

Др Андреј Кирбиш, Dr Andrej Kirbiš, PhD (Словенија-Slovenia)

Др Лазо Пендовски, Dr Lazo Pendovski, PhD, (Северна Македонија, North Macedonia)

Др Јанко Иванов, Dr Yanko Ivanov, PhD (Бугарска, Bulgaria)

Др Предраг Слијепчевић, Dr Predrag Slijepčević, PhD (Велика Британија-United Kingdom)

Др Ранко Шкрбић, Dr Ranko Škrbić, PhD (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Мајкл Гилсдорф, Dr Michael Gilsdorf, PhD (САД-United State of America)

Др Семир Лончаревић, Dr Semir Lončarević, PhD (Шведска-Sverige)

Др Нихад Феџић, Dr Nihad Fejzić, PhD, (БиХ, В&Н)

Др Неђељко Карабасил, Dr Nedjeljko Karabasil, PhD, (Србија-Serbia)

Др Милан Балтић, Dr Milan Baltić, PhD, (Србија-Serbia)

Др Весна Ђорђевић, Dr Vesna Đorđević, PhD, (Србија-Serbia)

Др Смиљана Параш, Dr Smiljana Paraš, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Жељко Сладојевић, Dr Željko Sladojević, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Биљана Пећанац, Dr Biljana Pećanac, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Родољуб Тркуља, Dr Rodoljub Trkulja, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Весна Калаба, Dr Vesna Kalaba, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Драган Касагић, Dr Dragan Kasagić, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Оливер Стевановић, Dr Oliver Stevanović, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

ТЕХНИЧКИ УРЕДНИК: -TECHNICAL EDITOR: др Бојан Голић, dr Bojan Golić (БиХ-РС, В&Н-RS)

ЛЕКТОР - LECTOR: Сандријела Касагић - Sandrijela Kasagić

Преводилац на енглески/Translator in English: Проф. Нивес Јаковљевић, Prof. Nives Jakovljević

РЕЦЕНЗИЈА: Часопис се упућује на двоструку рецензију еминентним стручњацима.

The journal is referred to a dual review by eminent experts.

ГОДИШЊЕ СЕ ОБЈАВЉУЈЕ 2 БРОЈА ЧАСОПИСА (јун/децембар или двоброј крајем године)

2 ISSUES OF MAGAZINES ARE PUBLISHED ANNUALLY (June/December or double issue at the end of the year)

Часопис је бесплатан и објављује се у електронској верзији и штампа у 300 примјерака. The magazine is free and is published in an electronic version and printed in 300 copies.

На основу Мишљења Министарства науке и технологије Републике Српске часопис је ослобођен пореза на промет. Based on the Opinion of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Srpska, the magazine is exempt from sales tax.

Штампа: Штампарија/Press "PRIMAPROM" Export-Import d.o.o. Banja Luka

Адреса издавача/Publisher's address: 78000 Бања Лука, Бранка Радичевића 18; 78000 Banja Luka, Branka Radičevića 18; Тел: 051/229-210.

ГЛАВНИ УРЕДНИК – EDITOR IN CHIEF, E-mail: drago.nedic@virs-vb.com,

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/>

<http://doirspska.nub.rs/index.php/VJRS>

Обим и политика часописа

Ветеринарски журнал Републике Српске је покренут 2001. године како би истраживачи код нас, у региону и широм свијета могли да објављују своја истраживања и радове. Часопис је посвећен унапређењу и ширењу научних сазнања о ветеринарским наукама и сродним академским дисциплинама. Ветеринарски журнал Републике Српске је отвореног приступа, рецензирани научни часопис ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске ”Др Васо Бутозан” Бања Лука, Република Српска/БиХ, посвећен објављивању оригиналних научних радова, прегледних научних радова, кратких саопштења и приказа случаја. Ветеринарски журнал Републике Српске објављује се на једном од језика у службеној употреби у Босни и Херцеговини и енглеском језику, у годишњим волуменима који се састоје од два броја, на моделу *Open Access* који омогућава високу видљивост радова. Ветеринарски журнал Републике Српске је индексиран као национални часопис. Упутства за пријављивање рукописа, припрему рада, процедуру рецензије и све остале детаље доступна су на страницама часописа. Ветеринарски журнал Републике Српске је часопис отвореног приступа. Сви радови могу се бесплатно преузети и користити у складу са *Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)*.

Scope and Policy of the Journal

Veterinary Journal of Republic of Srpska was launched in 2001 to offer researchers and professionals in the region and worldwide a place to publish their research findings and work. The Journal is devoted to the advancement and dissemination of scientific knowledge concerning veterinary sciences and related academic disciplines. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is an open access, peer-reviewed scientific journal published by the PI Veterinary Institute Republic of Srpska „Dr. Vaso Butozan“ Banja Luka, Republic of Srpska/ B&H, and dedicated to the publication of original scientific paper, review scientific paper, short communications, case report. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is published in one of the languages in official use in Bosnia and Herzegovina and English, in yearly volumes comprising two issues, on an Open Access model which allows high visibility of articles. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is indexed as a national journal. The instructions for manuscript submission, paper preparing, peer-review procedure and all other details are available on the Journal homepage.

Veterinary Journal of Republic of Srpska is an Open Access Journal. All articles can be downloaded free of charge and used in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

САДРЖАЈ - CONTENTS

EFEKTI MENTOLA I MONEPANTELA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG NERVNOMIŠIĆNOG PREPARATA <i>ASCARIS SUUM</i> Đorđe S. MARJANOVIĆ, Dragana MEDIĆ, Tihomir MARIĆ, Miodrag JOVANOVIĆ, Stevan MITKOVIĆ, Saša M. TRAILOVIĆ	5
EFFECTS OF MENTHOL AND MONEPANTEL ON THE CONTRACTIONS OF THE ISOLATED NEUROMUSCULAR PREPARATION OF <i>ASCARIS SUUM</i> Đorđe S. MARJANOVIĆ, Dragana MEDIĆ, Tihomir MARIĆ, Miodrag JOVANOVIĆ, Stevan MITKOVIĆ, Saša M. TRAILOVIĆ	13
КУЛИКОИДЕ КАО ВЕКТОРИ ОРБИВИРУСА, УЗРОЧНИКА НАРОЧИТО ОПАСНИХ ИНФЕКТИВНИХ БОЛЕСТИ ОД ЗНАЧАЈА ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ Наташа СТЕВИЋ, Драго НЕДИЋ, Соња РАДОЈИЧИЋ	21
CULICOIDES AS VECTORS OF ORBIVIRUSES, CAUSATIVE AGENTS OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIOUS DISEASES OF IMPORTANCE FOR VETERINARY MEDICINE Nataša STEVIĆ, Drago NEDIĆ, Sonja RADOJIČIĆ	38
KLINIČKI ENDOMETRITIS KRAVA: KORELACIJA TELESNE KONDICIJE, KVALITETA VAGINALNE SLUZI, LAKTACIJE, DNEVNE MLEČNOSTI I PROCENTA POLIMORFONUKLEARNIH ĆELIJA U CITOLOŠKOM RAZMAZU ENDOMETRIJUMA Bojan MILOVANOVIĆ, Milan MALETIĆ, Nemanja ZDRAVKOVIĆ, Nemanja JEZDIMIROVIĆ, Slobodanka VAKANJAC, Jovan BLAGOJEVIĆ, Branislav KURELJUŠIĆ	54
CLINICAL ENDOMETRITIS IN COWS: CORRELATION OF BODY CONDITION, QUALITY OF VAGINAL MUCUS, LACTATION, DAILY MILK PRODUCTION AND THE PERCENTAGE OF POLYMORPHONUCLEAR CELLS IN THE CYTOLOGICAL SMEAR OF THE ENDOMETRIUM Bojan MILOVANOVIĆ, Milan MALETIĆ, Nemanja ZDRAVKOVIĆ, Nemanja JEZDIMIROVIĆ, Slobodanka VAKANJAC, Jovan BLAGOJEVIĆ, Branislav KURELJUŠIĆ	63

МИКРОБИОЛОШКИ СТАТУС ВОДЕ ЗА ПИЋЕ СА БРОЈЛЕРСКИХ ФАРМИ И СПОСОБНОСТ СТВАРАЊА БИОФИЛМА ИЗОЛОВАНИХ ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА

Бојан ГОЛИЋ, Александра ШМИТРАН, Љиљана БОЖИЋ, Драган
КНЕЖЕВИЋ, Дејана КРНЕТА, Горан ВАСИЛИЋ, Дејан ЛАУШЕВИЋ,
Жељко ЦВЕТНИЋ, Драго Н. НЕДИЋ 72

MICROBIOLOGICAL STATUS OF DRINKING WATER FROM BROILER FARMS AND BIOFILM-FORMING ABILITY OF ISOLATED PATHOGENIC BACTERIA

Bojan GOLIĆ, Aleksandra ŠMITRAN, Ljiljana BOŽIĆ, Dragan KNEŽEVIĆ,
Dejana KRNETA, Goran VASILIC, Dejan LAUŠEVIĆ, Željko CVETNIĆ,
Drago N. NEDIĆ 88

ПРОЦЕНА КВАЛИТЕТА МЛЕКА И ПРОИЗВОДА ОД МЛЕКА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ

Радослава Савић РАДОВАНОВИЋ, Силвана СТАЈКОВИЋ, Јасна
КУРЕЉУШИЋ, Анђела ЦВЕТКОВИЋ 102

ASSESSMENT OF THE QUALITY OF MILK AND DAIRY PRODUCTS IN THE REPUBLIC OF SERBIA

Radoslava Savić RADOVANOVIĆ, Silvana STAJKOVIĆ, Jasna
KURELJUŠIĆ, Anđela CVETKOVIĆ 115

ЖИВИНАРСКА ПРОИЗВОДЊА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ – ТРЕНУТНО СТАЊЕ И ПЕРСПЕКТИВЕ

Стамен РАДУЛОВИЋ, Драган ШЕФЕР, Радмила МАРКОВИЋ, Дејан
ПЕРИЋ, Јасна СТЕВАНОВИЋ, Бојан СТОЈАНОВИЋ, Александра
ИВЕТИЋ, Драго НЕДИЋ 128

POULTRY PRODUCTION IN THE REPUBLIC OF SERBIA - CURRENT SITUATION AND PERSPECTIVES

Stamen RADULOVIĆ, Dragan ŠEFER, Radmila MARKOVIĆ, Dejan
PERIĆ, Jasna STEVANOVIĆ, Bojan STOJANOVIĆ, Aleksandra IVETIĆ,
Drago NEDIĆ 147

УЧЕСТАЛОСТ РЕПРОДУКТИВНИХ ПОРЕМЕЋАЈА ПАСА

Иван ГАЛИЋ, Иван СТАНЧИЋ, Јован СПАСОЈЕВИЋ, Бојан ТОХОЉ,
Сандра НИКОЛИЋ, Вук ВРАЧАР, Михајло ЕРДЕЉАН, Тијана КУКУРИЋ,
Драгана ТОМАНИЋ, Зорана КОВАЧЕВИЋ 165

FREQUENCY OF REPRODUCTIVE DISORDERS IN DOGS

Ivan GALIĆ, Ivan STANČIĆ, Jovan SPASOJEVIĆ, Bojan TOHOLJ, Sandra
NIKOLIĆ, Vuk VRAČAR, Mihajlo ERDELJAN, Tijana KUKURIĆ,
Dragana TOMANIĆ, Zorana KOVAČEVIĆ 176

UTICAJ EKOLOŠKIH FAKTORA NA KONSTITUCIJU MAGARACA

Milivoje UROŠEVIĆ, Dejana ĆUPIĆ MILADINOVIĆ, Panče DAMESKI,
Igor ZDRAVEVSKI, Ružica TRAILOVIĆ, Radomir MANDIĆ, Edward
MUSIWA NENGOMASHA, Nikola CUKIĆ, Milena ĐORĐEVIĆ 186

**THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE
CONSTITUTION OF DONKEYS**

Milivoje UROŠEVIĆ, Dejana ĆUPIĆ MILADINOVIĆ, Panče DAMESKI,
Igor ZDRAVEVSKI, Ružica TRAILOVIĆ, Radomir MANDIĆ, Edward
MUSIWA NENGOMASHA, Nikola CUKIĆ, Milena ĐORĐEVIĆ 193

**АУЈЕСКИЈЕВА БОЛЕСТ КОД ЛОВАЧКОГ ПСА НА ТЕРИТОРИЈИ
РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ**

Срђан Глигорић, Драган Кнежевић, Драган Касагић, Димитрије Глишић,
Дарко Маринковић 201

**AUJESZKY'S DISEASE IN HUNTING DOG IN THE TERRITORY OF
THE REPUBLIC OF SRPSKA**

Srđan GLIGORIĆ, Dragan KNEŽEVIĆ, Dragan KASAGIĆ, Dimitrije
GLIŠIĆ, Darko MARINKOVIĆ211

**ZNAČAJ OCENE I STALNE KONTROLE BIOSIGURNOSTI NA
FARMAMA GOVEDA I SVINJA**

Jovan BOJKOVSKI, Sreten NEDIĆ, Sveta ARSIĆ, Aleksandra MITROVIĆ,
Ivan PAVLOVIĆ, Milan NINKOVIĆ, Jasna PRODANOV-RADULOVIĆ... 221

**THE IMPORTANCE OF ASSESSMENT AND CONTINUOUS
CONTROL OF BIOSECURITY ON CATTLE AND PIG FARMS**

Jovan BOJKOVSKI, Sreten NEDIĆ, Sveta ARSIĆ, Aleksandra MITROVIĆ,
Ivan PAVLOVIĆ, Milan NINKOVIĆ, Jasna PRODANOV-RADULOVIĆ229

УПУТСТВО АУТОРИМА И РЕЦЕНЗЕНТИМА 238
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND REVIEWERS 247

DOI 10.7251/VETJSR2401005M

UDK 547.48:616.995.132

*Originalni naučni rad***EFEKTI MENTOLA I MONEPANTELA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG NERVNOMIŠIĆNOG PREPARATA *ASCARIS SUUM*****Đorđe S. MARJANOVIĆ¹, Dragana MEDIĆ¹, Tihomir MARIĆ¹, Miodrag JOVANOVIĆ², Stevan MITKOVIĆ², Saša M. TRAILOVIĆ^{1*}**¹ Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija² Toplička akademija strukovnih studija, Prokuplje, Srbija

*Korespondentni autor: Saša M. Trailović, sasa@vet.bg.ac.rs

Sažetak

Parazitske nematode životinja dovode do ozbiljnih poremećaja zdravstvenog stanja, visokih ekonomskih gubitaka u stočarstvu a često su i zoonoze što predstavlja direktnu opasnost po zdravlje ljudi. Prevencija i lečenje parazitskih infekcija obavlja se primenom lekova ali je savremena antiparazitska farmakoterapija suočena sa nekoliko velikih izazova. Razvoj rezistencije parazita, ograničena mogućnost povećanja doza postojećih lekova zbog potencijalne toksičnosti, nedostatak novih antiparazitika i dugačka karenca su razlozi da se sve više istražuje mogućnost antiparazitske primene supstanci biljnog porekla. U ovom radu prikazujemo ispitivanje anthelmintičkog dejstva terpenoida mentola na modelu kontrakcija nervnomišićnog preparata parazitske nematode *Ascaris suum*. Svi lekovi holinergički agonisti (levamizol, pirantel, morantel i dr.), dovode do smrti parazita tako što izazivaju snažnu kontrakciju njihovih mišića. U našem istraživanju mentol sam po sebi nije izazvao promene tonusa nervnomišićnog preparata *Ascaris suum* ali je signifikantno potencirao kontrakcije izazvane acetilholinom i pirantelom, čime je ispoljio karakteristike alosteričnog modulatora nAChR i to posebno L tipa. Ovo povećanje kontraktilnosti je osetljivo na monepantel, antagonistu nAChR. Potencirajući efekt mentola na kontrakcije *Ascaris suum* mogao bi da se iskoristi u kombinovanoj terapiji sa holinergičkim agonistima pirantelom i levamizolom, čime bi im se povećala efikasnost bez povećanja doza a smanjila mogućnost razvoja rezistencije parazita.

Ključne reči: mentol, monepantel, *Ascaris suum*, nAChR.**UVOD**

Sve veći zdravstveni problem u veterinarskoj i humanoj medicini su infekcije ljudi i životinja parazitskim nematodama. Valjkasti crvi ili nematode su najrazličitiji od svih vrsta životinja i do sada je opisano preko 80.000 vrsta, od kojih je više od 15.000 parazitskih (Hugot i sar., 2001). Na osnovu podataka Svetske zdravstvene organizacije iz 2018. godine, više od 1,5 milijarde ljudi, ili 24% svetske populacije, inficirano je

barem jednom vrstom crevnih parazita, koje uglavnom uključuju valjkaste crve (*Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura*) i pantljičare (*Necator americanus* i *Ancylostoma duodenale*). Parazitske nematode životinja dovode do ozbiljnih poremećaja zdravstvenog stanja, visokih ekonomskih gubitaka u stočarstvu, a neretko su i zoonoze, odnosno predstavljaju direktnu opasnost po zdravlje ljudi (Paterson i Barber, 2007). Glavni način prevencije i suzbijanja parazitskih infekcija je primena lekova-anthelmintika, ali je savremena antiparazitska farmakoterapija suočena sa nekoliko velikih izazova. Sve veći broj izveštaja odnosi se na rezistenciju parazitskih nematoda prema klasičnim antiparazitskim lekovima. Sa duge strane, za razliku od antimikrobnih lekova, čije su doze bezbedne čak i posle povećanja u cilju suzbijanja rezistencije, povećanje doza antiparazitika često ima za posledicu ispoljavanje toksičnosti. Posebno važna za veterinarsku medicinu je činjenica da većina antiparazitskih lekova zahteva dug period karence posle primene kod životinja čija su tkiva namenjena za ishranu ljudi (Martin i sar., 2004). Ovo su neki od najvažnijih razloga koji su farmakološka istraživanja usmerili prema potencijalnoj primeni biljnih proizvoda, umesto konvencionalnih sintetskih antiparazitskih lekova. Biljke stvaraju esencijalna ili etarska ulja kao organske produkte sekundarnog metabolizma. Esencijalna ulja (odnosno njihovi aktivni principi) su na osnovu farmakoloških karakteristika (antimikrobnih, antiparazitskih i dr.) potencijalno najozbiljniji alternativni lekovi i biocidi. Njihovi aktivni principi su sposobni da efikasno i bezbedno zamene klasične antiparazitske lekove ili da im značajno potenciraju dejstvo, bez potrebe za povećanjem njihove doze.

Mentol je dobro poznato jedinjenje, monoterpenoid, koji se u prirodi nalazi u visokom procentu u etarskom ulju nane (*Mentha piperita*), sa karakterističnim ukusom i mirisom. U literaturi su opisana svojstva mentola kao lokalnog anestetika ali i pozitivna analgetska dejstva na kožu i sluznice (Patel i sar., 2007). U našem ranijem istraživanju pokazali smo da je mentol pozitivni alosterični modulator nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) parazitskih nematoda (*Ascaris suum* i *Oesophagostomum dentatum*) (Choudhary i sar., 2019).

Prošlo je više od 35 godina od otkrića avermektina, poslednje velike grupe efikasnih antiparazitskih lekova. Svi ostali, kasnije otkriveni potencijalni lekovi, uglavnom nisu zadovoljili kriterijume za masovniju upotrebu. Monepantel je predstavnik grupe aminoacetonitrila (AAD), jedne od najnovijih klasa antihelmintika, za koje se smatra, na osnovu istraživanja proizvođača, da deluju kao alosterični modulatori nAChR. U studijama koje su objavljene kasnije, opisuje se da monepantel deluje kao antagonist nAChR (Abongwa i sar., 2018). Specifičan mehanizam dejstva ukazivao je da monepantel može da bude veoma značajan novi lek u farmakoterapiji parazitskih infekcija.

U ovom radu prikazujemo istraživanja dejstva mentola na kontrakcije izolovanog nervnomišićnog preparata *Ascaris suum* (*A. suum*), izazvane sa ACh ili pirantelom, kao i uticaj monepantela na efekat mentola.

MATERIJALI I METODE

Parazitska nematoda svinja *A. suum* je dopremana u termosima sa klanice u okolini Beograda (Ambar), neposredno posle čišćenja creva i prikupljanja u posebno pripremljenom rastvoru (Lockes solution). Sastav Lockes solution je standardizovan (mM): NaCl 155, KCl 5, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1.5 i glukoza 5. Nematode su u laboratoriji čuvane u istom rastvoru, koji je održavan na temperaturi 32-36°C u vodenom kupatilu. Lockes rastvor je menjan svakih 12 sati, tokom 5 dana.

U ispitivanjima su korišćene samo adultne ženke askarisa, jer su većih dimenzija i brojnije su u populaciji parazita. Nervnomišićni preparat za ispitivanje kontrakcija pripreman je disekcijom prednjeg dela tela parazita 2 do 3 cm kaudalno od glave. Daljim odsecanjem tkiva između dve crvene linije longitudinalno, dobijan je preparat (segment) uvek istih dimenzija (1cm) koji je dalje korišćen.

Pripremljeni segmet askarisa postavljan je u komoru (kupačice) zapremine 20 ml, koja je ispunjena sa *Ascaris* Perienteric Fluid Ringer/APF Ringer standardnog sastava (mM): NaCl 23, Na-acetat 110, KCl 24, CaCl₂ 6, MgCl₂ 5, glukoza 11, HEPES 5, sa vrednosti pH 7,6. Jedan kraj segmenta pričvršćen je za kukicu na dnu kupatila, a drugi deo je koncem zakačen za izometrijski transdjuser koji je preko interfejsa i amplifajera povezan sa PC kompjuterom. Kontinuirano mešanje aplikovanih supstanci u kupatilu obezbeđeno je stalnim ubrizgavanjem ambijentalnog vazduha električnom pumpom za vazduh, pri čemu kretanje mehurića nije uticalo na kontrakcije. Nakon postavljanja u kupatilo i povezivanja sa izometrijskim transdjuserom, preparat je mikrometarskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen početnoj tenziji od 0,5-1,0g tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao na oko 0,5g, aplikovane su ispitivane supstance a zatim su praćene i merene kontrakcije u realnom vremenu. Kontrakcije su praćene i beležene softverom eLAB 44 (ElUnit, Beograd).

Korišćen je protokol aplikacije rastućih koncentracija ispitivanih supstanci, koje su poznate kao agonisti nikotinskog receptora (acetilholin i pirantel), i supstanci u određenim koncentracijama za koje smo pretpostavili da će efekte ovih supstanci modulirati (mentol i monepantel). Posle svake maksimalne kontrakcije preparat je ispiran.

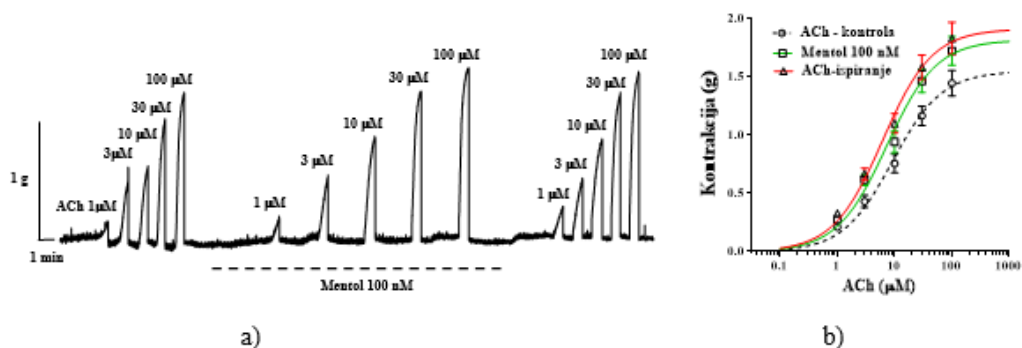
U ispitivanjima je korišćen acetilholin-hlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), monepantel (Zolvix®, Novartis, USA), pirantel-citrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i mentol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Statistička analiza dobijenih rezultata obavljena je u programu Graph Pad Prism, Version 6.0 (San Diego, Ca, USA). Razlike između serija rezultata poređene su analizom varijanse (ANOVA), odnosno Tukey-testom, dok je dozna zavisnost dobijenih efekata analizirana nelinearnom regresijom. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ±SE.

REZULTATI

Na osnovu podataka iz naših prethodnih istraživanja (Choudhary i sar., 2019), testirali smo efekat 100nM mentola na kontrakcije nervnomišićnog preparata *A. suum*

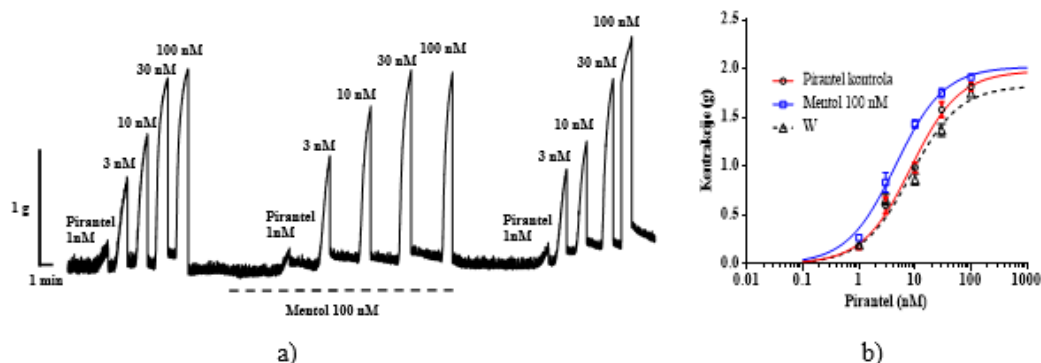
izazvanih rastućim koncentracijama ACh (1, 3, 10, 30 i 100mM). Na Slici 1a prikazan je originalni zapis kontrakcija bez i u prisustvu 100nM mentola. Dobijeni rezultati kontrakcija obrađeni su nelineranom regresijom, na osnovu kojih je određena vrednost srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) ACh. Kontrolna vrednost je iznosila $9,15 \pm 1,22$ mM, u prisustvu mentola EC_{50} je bila smanjena na $7,29 \pm 1,21$ mM, dok je posle uklanjanja mentola iz medijuma bila još niža, $6,19 \pm 1,20$ mM. Istovremeno je rasla vrednost maksimalnog efekta (E_{max}). Kontrolna E_{max} je bila $1,55 \pm 0,09$ g, u prisustvu mentola porasla na $1,82 \pm 0,09$ g i nastavila je da raste i posle ispiranja do $1,91 \pm 0,09$ g (Slika 1b).



Slika 1

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i dejstvo 100nM mentola na te kontrakcije
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktilnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100nM mentola (n=6)

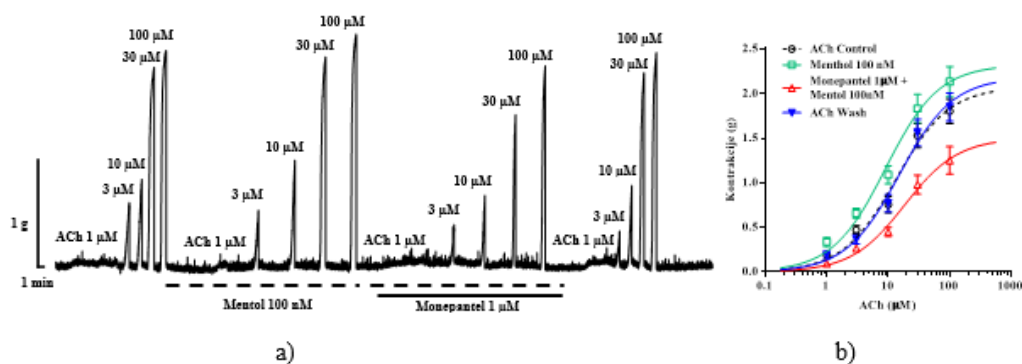
Ispitali smo i dejstvo mentola na kontrakcije *A. suum* izazvane pirantelom (Slika 2a i 2b). Kontrolna EC_{50} pirantela iznosila je $8,42 \pm 1,14$ nM, u prisustvu mentola, signifikantno je smanjena na $4,51 \pm 1,11$ nM ($p=0,0483$), dok se posle ispiranja ponovo vratila na kontrolni nivo ($8,42 \pm 1,18$ nM). Maksimalni efekat se vrlo malo menjao, sa $1,98 \pm 0,09$ g u kontroli na $2,02 \pm 0,05$ g u prisustvu mentola i $1,82 \pm 0,08$ g posle ispiranja.



Slika 2

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela i dejstvo 100nM mentola na te kontrakcije
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktilnog efekta pirantela bez i u prisustvu 100nM mentola (n=5)

U trećem delu ispitivanja testirali smo dejstvo monepantela na potencirajući efekat mentola u kontrakcijama izazvanim ACh (Slika 3a i 3b). Kontrolna vrednost EC_{50} za ACh bila je $13,30 \pm 1,25 \text{ mM}$, ali je inkubacija sa 100nM mentola imala za posledicu smanjenje EC_{50} na $9,04 \pm 1,24 \text{ mM}$. Međutim, posle dodavanja 1mM monepantela, vrednost EC_{50} ACh je u odnosu na kontrolu signifikantno ($p=0.0245$) porasla na $18,48 \pm 1,33 \text{ mM}$. Ova vrednost je bila signifikantno viša i od EC_{50} ACh u prisustvu mentola ($p<0,0001$), ali je posle uklanjanja monepantela iz medijuma porasla čak i nešto iznad kontrolne vrednosti ($15,30 \pm 1,27 \text{ mM}$). Inkubacija nervnomišićnog preparata *A. suum* sa 100nM mentola izazvala je povećanje maksimalnog efekta E_{max} sa $2,07 \pm 0,14 \text{ g}$ na $2,32 \pm 0,14 \text{ g}$, ali je inkubacija sa monepantelom (1mM) signifikantno smanjila ($p=0,0418$ u odnosu na kontrolu i $p=0,0011$ u odnosu na kontrakcije u prisustvu mentola) E_{max} na $1,50 \pm 0,15 \text{ g}$. Interesantno je da je posle ispiranja preparata, odnosno uklanjanja mentola i monepantela, vrednost E_{max} bila viša nego kontrolna i dostigla je $2,18 \pm 0,17 \text{ g}$.



Slika 3

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina, stimulacija kontrakcija sa 100nM mentola i inhibicija sa 1μM monepantela (isprekidana linija: inkubacija sa 100nM mentola; puna linija: inkubacija sa 1μM monepantela)
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktilnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100nM mentola ili mentola i 1mM monepantela (n=6)

DISKUSIJA

Dobijeni rezultati su pokazali da mentol pojačava kontrakcije nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvane ACh. Inkubacija sa 100nM mentola smanjuje vrednost EC_{50} ACh i povećava maksimalni kontraktilni efekat za oko 20%. Međutim, sam po sebi mentol nije izazivao promene tonusa. Ovakvi rezultati potvrđuju naše prethodno publikovano istraživanje, u kome smo dobili sličan efekat mentola na nAChR *A. suum* i *Oesophagostomum dentatum* i pokazali da je on najverovatnije alosterični modulator nAChR parazitskih nematoda (Choudhary i sar., 2019).

Na osnovu farmakoloških karakteristika, mišićni nAChR nematoda ima sličnosti na neuronskim tipom nAChR kičmenjaka, jer je relativno neosetljiv na blokadu alfa-bungarotoksinom (Tornøe i sar., 1995). Za razliku od kičmenjaka, međutim, nematode poseduju više od jednog tipa nAChR, koji se nalazi u nervno-mišićnim sinapsama odrasle nematode. *A. suum* ima najmanje tri tipa nAChR koji se razlikuju po osetljivosti na različite agoniste i karakteristikama jonskog kanala koji regulišu. Svaki od tri podtipa je imenovan na osnovu agoniste na koji je pretežno osetljiv: N tip (preferira nikotin i oksantel), L tip (preferira levamisol i pirantel) i B tip (preferira befenijum) (Martin i sar., 2004; Robertson i sar., 2002). U našem ranijem istraživanju sa mentolom pokazalo se da on pre svega stimuliše efekte ACh, što je razumljivo jer je mesto vezivanja ACh dobro konzervirano u svim tipovima nACh receptora. Međutim, mentol je dobro stimulatивно delovao na L tip, ali vrlo slabo na N tip nAChR. Upravo iz ovog razloga testirali smo dejstvo mentola na kontrakcije izazvane pirantelom. Mentol je potencirao dejstvo pirantela signifikantno smanjujući mu vrednost EC_{50} , uz minimalno povećanje E_{max} . S obzirom da je pirantel agonist, pre svega L tipa nAChR, ovi rezultati

su u saglasnosti sa prethodno publikovanim (Choudhary i sar., 2019). Posebno je bilo interesantno ispitati dejstvo monepantela, koji je negativni alosterični modulator nAChR nematoda (Abongwa i sar., 2018). U našem ispitivanju monepantel je potpuno neutralisao stimulativno dejstvo mentola i signifikantno inhibisao kontraktilni efekt ACh, povećavajući vrednost njegove EC_{50} i smanjujući E_{max} .

ZAKLJUČAK

Prezentovano istraživanje pokazuje da botanički antihelmintici mogu ublažiti pritisak na ograničenu grupu dostupnih antihelmintika. Pozitivna alosterična modulacija nAChR koju ispoljava mentol bila bi korisna u kombinovanoj terapiji sa holinergičkim antihelminticima kao što su pirantel ili levamizol, čime bi se povećala njihova efikasnost bez povećanja doze i smanjila mogućnost razvoja rezistencije parazita.

Zahvalnica

Istraživanje je podržano sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-136/2025-03/200143) i sredstvima Fonda za nauku Republike Srbije (#GRANT br. 7355 – FARMASCA).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Abongwa M., Marjanovic D. S., Tipton J. G., Zheng F., Martin R. J., Trailovic S. M., Robertson A. P. (2018): Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8(1):36-42.
- Choudhary S., Marjanović D. S., Wong C. R., Zhang X., Abongwa M., Coats J. R., Trailović S. M., Martin R. J., Robertson A. P. (2019): Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 9:44-53.
- Hugot J. P., Baujard P., Morand S. (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3:199-208.
- Martin R. J., Clark C. L., Trailović S. M., Robertson A. P. (2004): Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *International Journal for Parasitology*, 34(9):1083-1090.
- Patel T., Ishiui Y., Yosipovitch G. (2007): Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(5):873-878.
- Paterson S., Barber R. (2007): Experimental evolution of parasite life history traits in *Strongyloides ratti* (Nematoda). *Proc Biol Sci*, 274:146-174.
- Robertson A. P., Clark C. L., Burns T. A., Thompson D. P., Geary T. G., Trailovic S. M., Martin R. J. (2002): Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide
-

distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302:853-60.

Tornøe C., Bai D., Holden-Dye L., Abramson S. N., Sattelle D. B. (1995): Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin, and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*, 33:411-24.

DOI 10.7251/VETJEN2401013M

UDK 547.48:616.995.132

Original Scientific Paper

EFFECTS OF MENTHOL AND MONEPANTEL ON THE CONTRACTIONS OF THE ISOLATED NEUROMUSCULAR PREPARATION OF *ASCARIS SUUM*

Đorđe S. MARJANOVIĆ¹, Dragana MEDIĆ¹, Tihomir MARIĆ¹, Miodrag JOVANOVIĆ², Stevan MITKOVIĆ², Saša M. TRAILOVIĆ^{1*}

¹University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Serbia

²Toplica Academy of Applied Studies, Prokuplje, Serbia

*Corresponding author: Saša M. Trailović, sasa@vet.bg.ac.rs

Summary

Parasitic nematodes in animals lead to serious health disorders, high economic losses in animal husbandry, and often are zoonoses, which represent a direct danger to human health. Prevention and treatment of parasitic infections involves the use of medication, but modern antiparasitic pharmacotherapy is faced with several major challenges. The development of parasite resistance, the limited possibility of increasing the doses of existing drugs due to potential toxicity, the lack of new antiparasitics and the long withdrawal period are the reasons why the possibility of antiparasitic application of substances of plant origin is increasingly being researched. In this paper, we present a study of the anthelmintic effect of the menthol terpenoid in the model of contractions of the neuromuscular preparation of the parasitic nematode *Ascaris suum*. All cholinergic agonist drugs (levamisole, pyrantel, morantel, etc.) lead to the death of parasites by causing strong contraction of their muscles. In our research, menthol by itself did not cause changes in the tone of the neuromuscular preparation of *Ascaris suum*, but it significantly potentiated the contractions caused by acetylcholine and pyrantel, thus exhibiting the characteristics of an allosteric modulator of nAChR, especially of the L type. This increase in contractility is sensitive to monepantel, an nAChR antagonist. The potentiating effect of menthol on the contractions of *Ascaris suum* could be used in combined therapy with cholinergic agonists pyrantel and levamisole, which would increase their effectiveness without increasing doses and reduce the possibility of developing parasite resistance.

Keywords: menthol, monepantel, *A. suum*, nAChR

INTRODUCTION

Infections of humans and animals with parasitic nematodes are a growing health problem in veterinary and human medicine. Roundworms or nematodes are the most diverse of all animal species and over 80,000 species have been described so far, of which more than 15,000 are parasitic (Hugot et al., 2001). Based on data from the

World Health Organization in 2018, more than 1.5 billion people, or 24% of the world's population, are infected with at least one type of intestinal parasite, which mainly includes roundworms (*Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura*) and tapeworms (*Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*). Animal infections with nematodes lead to serious health disorders, high economic losses in animal husbandry, and are often zoonoses, i.e. they pose a direct threat to human health (Paterson and Barber, 2007). The primary way of preventing and suppressing parasitic infections is the use of anthelmintic drugs, but modern antiparasitic pharmacotherapy is faced with several major challenges. An increasing number of reports refer to the resistance of parasitic nematodes to classical antiparasitic drugs. On the other hand, in contrast to antimicrobial drugs, whose doses are safe even after increasing in order to suppress resistance, increasing the doses of antiparasitic drugs often results in the occurrence of toxicity. Particularly important for veterinary medicine is the fact that most antiparasitic drugs require a long withdrawal period after administration in animals whose tissues are intended for human consumption (Martin et al., 2004). We have only mentioned some of the most important reasons that directed pharmacological research towards the potential application of herbal products, instead of conventional synthetic antiparasitic drugs. Plants produce etheric or essential oils as organic products of secondary metabolism. Based on their pharmacological characteristics (antimicrobial, antiparasitic, etc.), essential oils (or their active ingredients) are potentially the most serious alternative medicines and biocides. Their active ingredients are able to effectively and safely replace classic antiparasitic drugs or significantly enhance their effect, without the need to increase their dosage.

Menthol is a well-known compound, a monoterpenoid that is found in nature in a high percentage in the essential oil of mint (*Mentha piperita*) with a characteristic taste and smell. The properties of menthol as a local anesthetic and positive analgesic effects on the skin and mucous membranes are described in the literature (Patel et al., 2007). In our earlier research, we showed that menthol is a positive allosteric modulator of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) of parasitic nematodes (*Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*) (Choudhary et al., 2019).

More than 35 years have passed since the discovery of avermectins, the last major group of effective antiparasitic drugs. All other, later discovered potential drugs, generally did not meet the criteria for mass use. Monepantel is a representative of the aminoacetonitrile group (AAD), one of the newest classes of anthelmintics, which are considered, based on the manufacturer's research, to act as allosteric modulator of nematode nAChR. Studies published later described monepantel as an nAChR antagonist (Abongwa et al., 2018). The specific mechanism of action indicated that monepantel could be a very important new drug in the pharmacotherapy of parasitic infections.

In this paper, we present research on the effect of menthol on the contractions of an isolated neuromuscular preparation of *Ascaris suum* (*A. suum*), induced by ACh or pyrantel, as well as the influence of monepantel on the effect of menthol.

MATERIALS AND METHODS

The parasitic pig nematode *A. suum* was delivered in temperature-controlled containers from a slaughterhouse in the vicinity of Belgrade (Ambar) immediately after gut cleaning and collection in a specially prepared - Lockes solution. The composition of Lockes solution was standardized (mM): NaCl 155, KCl 5, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1.5 and glucose 5. In the laboratory the nematodes were kept in the same solution, which was maintained at a temperature of 32-36°C in a water bath. Lockes solution was changed every 12 hours for 5 days. Only adult female *Ascaris* were used in the experiments because they are larger and more numerous in the parasite population. The neuromuscular preparation for testing contractions was prepared by dissection of the front part of the parasite's body 2 to 3 cm caudal to the head. By further cutting the tissue between the two red lines longitudinally, a preparation (segment) of always the same dimension (1 cm) was obtained, which was further used.

The prepared ascaris segment was placed in a chamber (bath) with a volume of 20 ml, which was filled with *Ascaris* Perienteric Fluid Ringer/APF of standard composition (mM): NaCl 23, Na-acetate 110, KCl 24, CaCl₂ 6, MgCl₂ 5, glucose 11, HEPES 5, with a pH value of 7.6. One end of the segment is attached to a hook on the bottom of the bath, while the other part is attached to an isometric transducer connected to a PC computer via an interface and amplifier. Continuous mixing of the applied substances in the bath was ensured by constant insertion of ambient air with an electric air pump, whereby the movement of the bubbles did not affect the contractions. After being placed in the bath and connected to the isometric transducer, the preparation is exposed to an initial tension of 0.5-1.0 g for 15-20 minutes with a micrometer regulator on the transducer support. When the basic tone stabilized at around 0.5 g, the tested substances were applied and then the contractions were monitored and measured in real time. Contractions were monitored and recorded with eLAB 44 software (ElUnit, Belgrade). A protocol of application of increasing concentrations of tested substances, nicotinic receptor agonists (acetylcholine and pyrantel) and substances in certain concentrations that we assumed would modulate the effects of these substances (menthol and monepantel) was used. After each maximal contraction, the preparation was washed off.

Acetylcholine chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), monepantel (Zolvix®, Novartis, USA), pyrantel citrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and menthol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used in the trials.

Statistical analysis of the obtained results was performed in the program Graph Pad Prism, Version 6.0 (San Diego, Ca, USA). Differences between series of results were compared by analysis of variance (ANOVA), i.e. Tukey-test, while the dose dependence of the obtained effects was analyzed by nonlinear regression. All results are expressed as means $\pm$ SE.

RESULTS

Based on data from our previous research (Choudhary et al., 2019), we tested the effect of menthol 100nM on contractions of *A. suum* neuromuscular preparations induced by increasing concentrations of ACh (1, 3, 10, 30 and 100mM). Figure 1a shows the original recording of contractions without and in the presence of 100nM menthol. The obtained results of contractions were processed by non-linear regression, based on which the value of the mean effective concentration (EC_{50}) of ACh was determined. The control value was 9.15 ± 1.22 mM, in the presence of menthol the EC_{50} was reduced to 7.29 ± 1.21 mM, while after the removal of menthol from the bath it was even lower, 6.19 ± 1.20 mM. At the same time, the value of the maximal effect (E_{max}) increased. The control E_{max} was 1.55 ± 0.09 g, in the presence of menthol it increased to 1.82 ± 0.09 g and continued to increase after washing to 1.91 ± 0.09 g (Figure 1b).

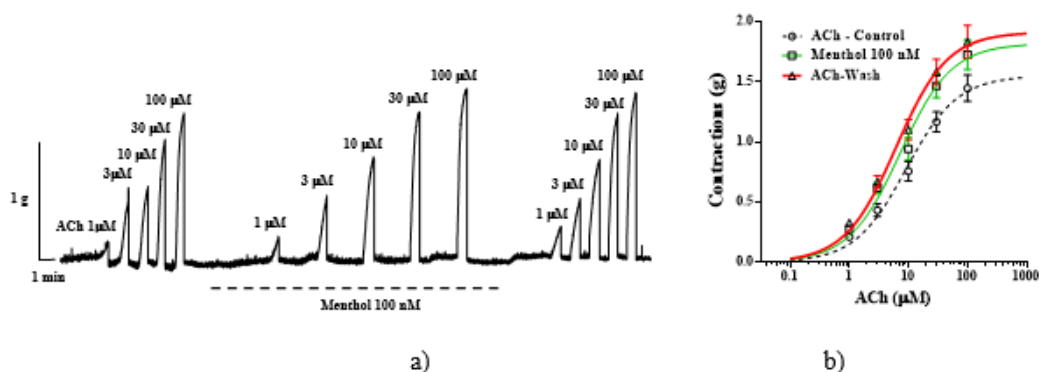
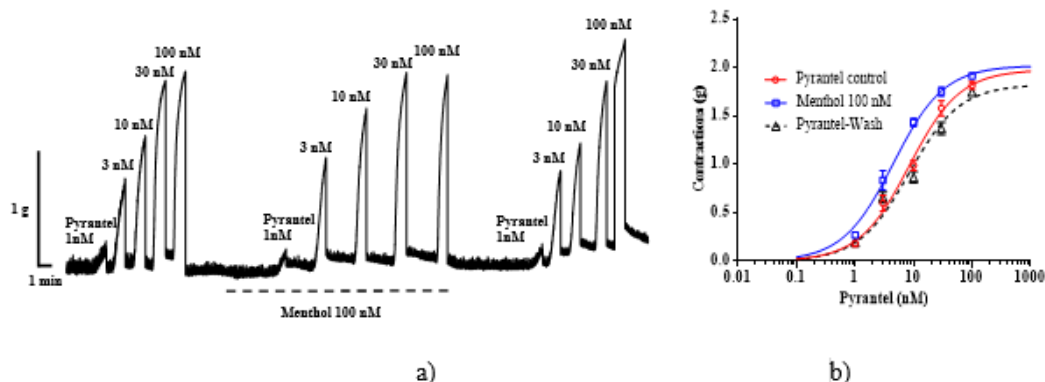


Figure 1

- Representative recording of isometric contractions of *A. suum* neuromuscular preparation induced by increasing concentrations of ACh and the effect menthol 100nM on these contractions
- Dose-dependent sigmoid curves of the contractile effect of ACh without and in the presence of menthol 100nM (n=6)

We also examined the effect of menthol on the contractions of *A. suum* caused by pyrantel (Figure 2a and 2b). The control EC_{50} of pyrantel was 8.42 ± 1.14 nM, in the presence of menthol, it was significantly reduced to 4.51 ± 1.11 nM ($p=0.0483$), while after washing it returned to the control level (8.42 ± 1.18 nM). On the other hand, the maximal effect was changed very little, from 1.98 ± 0.09 g in control series to 2.02 ± 0.05 g in the presence of menthol and 1.82 ± 0.08 g after washing.

**Figure 2**

- a) Representative recording of isometric contractions of the *A. suum* neuromuscular preparation induced by increasing concentrations of pyrantel and the effect of menthol 100nM on these contractions
- b) Dose-dependent sigmoid curves of the contractile effect of pyrantel without and in the presence of menthol 100nM (n=5)

In the third part of the study, we tested the effect of monepantel on the potentiating effect of menthol in ACh-induced contractions (Figure 3a and 3b). The control EC_{50} value for ACh was 13.30 ± 1.25 mM, but incubation with 100nM of menthol resulted in a decrease in EC_{50} to 9.04 ± 1.24 mM. However, after the addition of 1mM monepantel, the value of ACh EC_{50} compared to the control increased significantly ($p=0.0245$) to 18.48 ± 1.33 mM. This value was significantly higher than the EC_{50} of ACh in the presence of menthol ($p < 0.0001$), but after the removal of monepantel from the bath solution it increased even slightly above the control value (15.30 ± 1.27 mM). Incubation of the neuromuscular preparation of *A. suum* with 100nM of menthol caused an increase in the maximal effect (E_{max}) from 2.07 ± 0.14 g to 2.32 ± 0.14 g, but incubation with monepantel (1mM) significantly reduced ($p=0.0418$ compared to control and $p=0.0011$ compared to contractions in the presence of menthol) E_{max} to 1.50 ± 0.15 g. It is interesting that after washing the preparation, i.e. removing menthol and monepantel, the E_{max} value was higher than the control, reaching 2.18 ± 0.17 g.

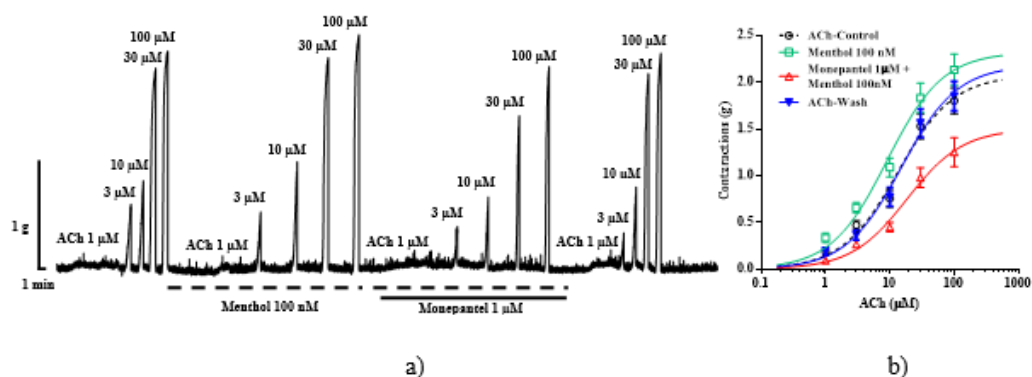


Figure 3

- a) Representative recording of isometric contractions of *A. suum* neuromuscular preparation induced by increasing concentrations of ACh, stimulation of contractions with 100nM of menthol and inhibition with 1μM monopantel (dashed line: incubation with 100nM menthol; solid line: incubation with 1μM monopantel)
- b) Dose-dependent sigmoidal curves of the contractile effect of ACh without and in the presence of 100nM menthol or menthol and 1mM monopantel (n=6)

DISCUSSION

The obtained results showed that menthol enhances ACh-induced contractions of the neuromuscular preparation of *A. suum*. Incubation with 100nM of menthol decreases the EC_{50} value of ACh and increases the maximal contractile effect (E_{max}) for about 20%. However, menthol itself did not cause changes in basal tone of preparation. These results confirm our previously published research where we obtained a similar effect of menthol on the nAChR of *A. suum* and *O. dentatum* expressed in *Xenopus laevis* oocytes and showed that it is most likely an allosteric modulator of the nAChR of parasitic nematodes (Choudhary et al., 2019).

Based on pharmacological characteristics, the nematode muscle nAChR has similarities to the neuronal type of vertebrate nAChR, as it is relatively insensitive to blockade by alpha-bungarotoxin (Tornøe et al., 1995). Unlike vertebrates, however, nematodes possess more than one type of muscle nAChR found in the neuromuscular synapses of the adult nematode. *A. suum* has at least three types of nAChRs that differ in their sensitivity to different agonists and the characteristics of the ion channel they regulate. Each of the three subtypes is named for the agonist to which it is predominantly sensitive, N type (preferring nicotine and oxanthel), L type (preferring levamisole and pyrantel), and B type (preferring buphenium) (Martin et al., 2004; Robertson et al., 2002). In our earlier research with menthol, it was shown that it primarily stimulates the effects of ACh, which is understandable because the ACh binding site is well conserved in all types of nACh receptors. However, menthol had a effective stimulatory effect on L-type but very weak on N-type of nAChR. Precisely for this reason, we tested the effect of menthol on pyrantel-induced contractions.

Menthol potentiated the action of pyrantel, significantly reducing its EC_{50} value with a minimal increase in E_{max} . Given that pyrantel is primarily an L-type nAChR agonist, these results are in agreement with our statement previously published (Choudhary et al., 2019). It was particularly interesting to examine the effect of monepantel, which is a negative allosteric modulator of the nematode nAChR (Abongwa et al., 2018). In our study, monepantel completely neutralized the stimulatory effect of menthol and significantly inhibited the contractile effect of ACh, increasing its EC_{50} value and decreasing E_{max} .

CONCLUSION

The research presented shows that herbal anthelmintics can relieve pressure on a limited group of available anthelmintics. Positive allosteric modulation of nAChR exhibited by menthol would be useful in combined therapy with cholinergic anthelmintics such as pyrantel or levamisole, which would increase their effectiveness without increasing the dose and reduce the possibility of development of parasite resistance.

Acknowledgements

The research was supported by funds of the Ministry of Science, Technological Development and Innovation of the Republic of Serbia (Contract No. 451-03-136/2025-03/200143) and the Science Fund of the Republic of Serbia, (#GRANT No. 7355 FARMASCA).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Abongwa M., Marjanovic D. S., Tipton J. G., Zheng F., Martin R. J., Trailovic S. M., Robertson A. P. (2018): Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8(1):36-42.
- Choudhary S., Marjanović D. S., Wong C. R., Zhang X., Abongwa M., Coats J. R., Trailović S. M., Martin R. J., Robertson A. P. (2019): Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 9:44-53.
- Hugot J. P., Baujard P., Morand S. (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3:199-208.
- Martin R. J., Clark C. L., Trailović S. M., Robertson A. P. (2004): Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *International Journal for Parasitology*, 34(9):1083-1090.
- Patel T., Ishiuiji Y., Yosipovitch G. (2007): Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(5):873-878.
-

- Paterson S., Barber R. (2007): Experimental evolution of parasite life history traits in *Strongyloides ratti* (Nematoda). *Proc Biol Sci*, 274:146-174.
- Robertson A. P., Clark C. L., Burns T. A., Thompson D. P., Geary T. G., Trailovic S. M., Martin R. J. (2002): Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302:853-60.
- Tornøe C., Bai D., Holden-Dye L., Abramson S. N., Sattelle D. B. (1995): Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin, and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*, 33:411-24.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401021S

UDK 616.988-036.22:595.42

Оригинални научни рад

КУЛИКОИДЕ КАО ВЕКТОРИ ОРБИВИРУСА, УЗРОЧНИКА НАРОЧИТО ОПАСНИХ ИНФЕКТИВНИХ БОЛЕСТИ ОД ЗНАЧАЈА ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

Наташа СТЕВИЋ*, Драго НЕДИЋ, Соња РАДОЈИЧИЋ

Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Наташа Стевић, natasas@vet.bg.ac.rs

Сажетак

У прошлости, дистрибуција вируса болести плавог језика широм света обухватала је подручја између приближно 35 степени јужне и 40 степени северне географске ширине, али недавно је дошло до његовог драматичног ширења у Европи до 58. степена северне географске ширине. Претпоставља се да је вирус у централну и западну Европу унесен транспортом заражених животиња или преношењем заражених куликоида ветром, као и непознатим путевима ширења. Данас се европске земље суочавају са редовним избијањем болести плавог језика изазваних различитим серотиповима. Очекује се да ће климатске промене утицати на дистрибуцију и ареал многих врста вектора због глобалног загревања и измењених образаца падавина. Климатске промене модификују дугорочне временске и климатске обрасце који утичу на понашање вектора-артропода. Пораст просечних зимских температура ваздуха омогућава преживљавање артропода и продужава период активности. Пример за то је појава серотипа 3 вируса болести плавог језика током лета 2023. године у Холандији, ширење вируса и његова поновна појава у 2024. години. У последњих 25 година, дошло је и до повећања броја серотипова куге коња који циркулишу на северним границама домета вируса у подсахарској Африци. Тренутна ситуација куге копитара подсећа на дистрибуцију вируса болести плавог језика пре изненадне експанзије на север Европе 2006. године. Преношење инфицираних куликоида ветром је посебно важно из перспективе контроле, јер чини забрану кретања пријемчивих животиња знатно мање ефикасном у спречавању ширења болести. Тренутно најважнија улога куликоида са аспекта јавног здравља јесте њихова способност као биолошких вектора да преносе *Oropouche* вирус, узročника Оропуш грознице људи.

Кључне речи: климатске промене, куликоиде, орбивируси, преживари, вектори.

УВОД

У протекле три деценије бележи се све већи број арбовирусних инфекција. Ово се приписује климатским променама које су углавном изазване људским

активностима, а које погодују појави и ширењу артропода на нове територије, као и отпорности и преношењу вируса. Болести изазване арбовирусима које могу да угрозе једну земљу, претња су по здравље људи и животиња, са потенцијално разорним друштвеним и економским последицама, а услед урбанизације, глобализације и климатских промена последњих година долази до експанзије арбовируса. Глобална дистрибуција болести плавог језика и епизоотске хеморагичне болести у свету значајно се променила последњих година, посебно због продора више серотипова вируса болести плавог језика у Европу. Неочекивана појава болести плавог језика или епизоотске хеморагичне болести, у вези је са потенцијалним последицама климатских промена на географску распрострањеност и тежину болести које се преносе векторима. Вируси болести плавог језика и епизоотске хеморагичне болести инфицирају домаће и дивље преживаре и изазивају клинички готово идентичне промене. Симптоми подразумевају оток и цијанозу језика, коронаритис папака, крварења и угинуће. Говеда се сматрају резервоарима вируса болести плавог језика и вируса епизоотске хеморагичне болести, јер су заражене животиње, иако обично без симптома, виремичне. Огромна генска разноликост ових орбивируса може довести до појаве нових серотипова са јединственим биолошким својствима, као и могућности не само хоризонталног већ и вертикалног преношења.

Различите врсте куликоида су примарни вектори арбовируса у различитим деловима света. Хематофагни инсекти из рода *Culicoides* распрострањени су широм света и у појединим регионима сезонски могу достићи велику бројност, што у многим деловима света утиче на сточарство, пољопривреду, шумарство и туризам, доводећи до великих економских губитака. Већина врста куликоида је хематофагна, хране се на свим кичмењацима, укључујући људе. Поред тога што су убоди непријатни, куликоиде могу преносити вирусе, протозое и нематоду током храњења, при чему неки вируси изазивају висок морбидитет и морталитет код преживара, коња и људи. Њихов највећи значај за ветеринарску медицину огледа се у томе што преносе бројне патогене домаћих и дивљих животиња, посебно орбивирусе, који изазивају неконтагиозне болести преживара. Примарни су вектори *Orbivirus* (вирус плавог језика, вирус епизоотске хеморагичне болести и вирус куге коња), *Orthobunyavirus*, *Oropouche*, *Akabane* и *Schmallenberg* вируса.

Постоји више путева уношења арбовируса које преносе куликоиде на нове територије, као што је пренос инфицираних куликоида ветром, увоз виремичних животиња, употреба нерегистрованих атенуираних вакцина (појава серотипова 6 и 11 вируса болести плавог језика у Европи). За сада путеви уношења серотипова 8 и 25 вируса болести плавог језика су непознати. Претпоставља се да је серотип 8 унет транспортом инфицираних куликоида, животиња и људи, или чак увозом резаног цвећа. Потенцијално је могућ и транспорт бродовима. Ипак, треба нагласити да су јаја куликоида веома осетљива на исушивање, па њихов

транспорт није вероватан пут уношења вируса у једну земљу. Присуство нисковирулентног серотипа 25 вируса болести плавог језика (*Toggenburg* вирус) је „случајно“ откривено током рутинског надзора високо патогеног серотипа 8 у Швајцарској (Carpenter и сар., 2013).

Вируси који се преносе векторима имају механизме „презимљавања“ за време периода ниских температура, како би опстали током зимских месеци, када су вектори неактивни. Механизми опстанка вируса у Европи укључују презимљавање у „дуговечним“ инсектима, продужено трајање виремје код преживара и вертикални начин преношења код преживара и вектора. Уз то треба нагласити да климатске промене утичу на векторе, њихову компетентност, способност преношења вируса, географску распрострањеност, екстринзични инкубациони период, трајање активности (касна јесен, рано пролеће), а такође и на геном вируса (Hudson и сар., 2023).

Куликоиде

Инсекти из фамилије *Ceratopogonidae* распрострањени су широм света. У свету постоји 6.206 врста двокрилаца из породице *Ceratopogonidae*. У оквиру фамилије *Ceratopogonidae* налазе се четири рода која се хране крвљу кичмењака (*Culicoides*, *Leptoconops*, *Lasiohelea* и *Austroconops*) од којих род *Culicoides*, са 1.347 описаних врста, има највећи значај када су инфективне болести у питању. До данас је из ових инсеката изоловано преко 50 арбовируса, од којих 45% није откривено код других артропода (Mellor и сар., 2000). Ови инсекти су потенцијални вектори узрочника инфективних болести, од којих највећи значај имају вирус болести плавог језика, вирус епизоотске хеморагичне болести, Шмаленберг вирус, вирус куге коња, као и *Oropouche* вирус, једини познати вирус који се преноси куликоидама на људе. Куликоиде су једни од најситнијих хематофагних инсеката чија дужина тела ретко прелази три милиметра. Развојни циклус се састоји од јајета, четири фазе ларви, лутке и одрасле јединке. Ларве су веома разнолике у погледу хабитуса, понашања и екологије и развијају се у влажним стаништима. Одрасле јединке могу бити и значајни опрашивачи. Женкама је неопходна исхрана протеинима за производњу јаја. Активни су у сумрак и зору. Присутни су у већем делу света са изузетком Антарктика и Новог Зеланда. За развој јаја, ларви и лутки неопходна су им станишта богата влагом, као што је влажно, органски обogaђено земљиште, које се често налази у околини фарми, а могу се наћи и на местима као што су пукотине у дрвећу, вегетација која трули, крајеви рибњака, влажна тла и одређене врсте балеге биљоједа. Због своје величине (1-2,5 mm), под повољним условима куликоиде лако могу бити ношене ветровима на велике удаљености. Доказано је присуство куликоида и на великим надморским висинама. Сматра се да је серотип 8 вируса епизоотске хеморагичне болести унет у Италију из Туниса управо на овај начин, преносом вектора ветром, што је исти пут преношења серотипа 3 вируса болести плавог језика 2017. године.

Истраживање ширења куликоида ветром је показало да зона високог ризика од ширења вектора ветром са места првих избијања серотипа 8 вируса епизоотске хеморагичне болести у Француској остаје углавном ограничена на југозападни део земље, али са могућим продорима на север до региона „Жиронде” или на исток дуж планина Пиринеја. Уз то, могуће је и ширење вектора ка северу Шпаније (Bibard и сар., 2024b). Док климатске промене могу утицати на будуће ширење заражених вектора ветром, транспорт заражених животиња је вероватнији начин уношења орбивируса у земљу и регион који има статус слободан од болести. Појава куге коња на Блиском истоку и у југозападној Азији од 1959. до 1962. и Северној Африци и Шпанији 1965. године последица је кретања номадских племена (Carpenter и сар., 2017). Увозом зебри из Намибије у Шпанију 1987. године унет је и серотип 4 вируса куге коња, а 2020. године на Тајланд је увозом копитара унет серотип 1.

Способност хематофагних инсеката да буду вектори патогена је урођена и генски одређена. Последица је еволутивне адаптације патогена током које је стекао способност да, избегавајући имунолошку одбрану артропода, инфицира вектора, у његовим ћелијама и органима се умножава и развија, доспева у пљувачне жлезде и пренесе на пријемчиву врсту током храњења вектора. Четири критеријума морају бити испуњена да би се утврдила векторска способност артропода за различите патогене: доказивање вируса у векторима ухваћеним на терену који нису узели оброк крви, демонстрирати способност да се инфицирају након храњења на зараженом домаћину или крвљу у којој је патоген, установити способност преношења патогена на домаћина убодом, и утврдити бројност и повезаност вектора на терену са одговарајућим пријемчивим домаћинима (Ruder и сар., 2015).

Куликоиде су биолошки вектори орбивируса што значи да вирус након ингестије инфицира ћелије средњег црева ових инсеката и у њима се умножава, одлази у телесну шупљину инсекта, а затим инфицира и пљувачне жлезде у којима се такође умножава. Тек тада се вирус може пренети на новог домаћина. Време које протекне од ингестије вируса до његовог доспевања у пљувачне жлезде вектора назива се екстринзични инкубациони период, а његово трајање зависи од активности РНК полимеразе вируса, која, са друге стране, зависи од температуре околине. На 15°C екстринзични инкубациони период траје неколико недеља, док на 30°C само неколико дана (Wittmann и сар., 2002). Након храњења куликоида и узимања оброка инфективне крви, вирус болести плавог језика улази у средње црево, умножава се и може да инфицира и друге органе. На температури од 25°C вирус из средњег црева у року од два дана од инфекције долази до пљувачних жлезда. Након уласка вируса у ацинусне ћелије пљувачних жлезда, вирус се поново репликује, а затим се вирусне честице ослобађају у терминалне ацинусе одакле се могу пренети пљувачком током убода вектора. За разлику од ћелија сисара, које су тешко оштећене процесом изласка вируса егзоцитозом,

ослобађање вируса из ћелија инсеката се дешава искључиво пупљењем мембране (Kampen и Werner, 2023). Време потребно вектору за варење крвног obroка се такође смањује на вишим температурама, повећавајући учесталост храњења. На температурама испод 12°C репликација вируса потпуно престаје, иако вирус може да опстане у инфицираним куликоидама и да настави репликацију ако дође до пораста температуре (Wellby и сар., 1996). На овако ниским температурама смањује се и активност вектора. Као резултат тога, преношење вируса је скоро потпуно прекинуто неколико месеци у години због хладног времена. Ипак, епизоотије се често настављају након периода који су далеко дужи од типичног животног века одраслог вектора или нормалног периода инфективности домаћина. За време зимских месеци артропode су неактивне, а сматра се да куликоиде презимљавају у стадијуму ларве. Током зиме у Европи, након првих мразева, одрасли облици куликоида су присутни у малом броју или потпуно одсутни. Истраживање у Немачкој показало је да су куликоиде из групе *Obsoletus* присутне скоро током целе године унутар штала што указује на висок ризик преношења вируса на преживаре у затвореном простору. У овој студији, *Obsoletus* група је била активна и у затвореном и на отвореном током свих месеци у години. Поједине врсте из комплекса *Pulicaris* биле су активне од месеца марта, али су биле присутне и током хладних месеци све до почетка децембра. Дакле, резултати показују да током године постоје периоди са ниском активношћу вектора, али не и без вектора (Groschupp и сар., 2023). Отпорност *C. sonorensis* на температуру -20°C и значајно исушивање у фази јајета може указивати на отпорност на промене климатских услова у будућности.

Истраживања указују да исте врсте куликоида учествују у преношењу болести плавог језика, епизоотске хеморагичне болести и куге коња. Од свих врста куликоида, у свету *Culicoides imicola* је најважнији вектор. Присутан је широм Африке, на Блиском и Средњем истоку, деловима јужне и југоисточне Азије и јужне Европе. Глобално најважнији вектор, *C. imicola*, до сада је откривен само у земљама Медитерана, а најсевернији део Европе где је присутан је југ Швајцарске (Groschupp и сар., 2023). Такође, још један значајан вектор у Африци, јужно од Сахаре је *C. bolitinos*, врста сродна *Imicola* комплексу. У Северној Америци главни вектор је *C. sonorensis* и најбоље је проучена врста *Ceratopogonida*. У централној и Јужној Америци то је *C. insignis*, а у Аустралији *C. brevitarsis* (Winder, 1978). Крајем двадесетог века претпостављало се да и аутохтоне врсте куликоида које су распрострањене и бројне широм северне Европе, *C. obsoletus* и *C. pulicaris* могу бити компетентни вектори. То је дефинитивно утврђено 2006. године, када је болест плавог језика избила у централној и северној Европи и када присуство *C. imicola* није установљено, већ само присуство *C. obsoletus* и *C. pulicaris* (Kampen и Werner, 2023). До избијања болести плавог језика 2006. године у централној и северној Европи, вирус се налазио углавном у Африци, Азији и подручју југа Европе где га је првенствено

преносила врста *C. imicola*. Избијање болести плавог језика у централној и северној Европи, где *C. imicola* није присутна, сугерише да су локалне врсте куликоида такође компетентни биолошки вектори (Meiswinkel и сар., 2007). Сматрало се да потенцијалну улогу вектора имају четири члана *Obsoletus* групе рода *Culicoides* (*Culicoides obsoletus sensu stricto*, *Culicoides scoticus*, *Culicoides dewulf*, *Culicoides chiopterus*) и три члана *Pulicaris* комплекса (*Culicoides pulicaris sensu stricto*, *Culicoides punctatus*, *Culicoides impunctatus*) (Nolan и сар., 2007; Savini и сар., 2005; Torina и сар., 2004; Caracappa и сар., 2003). Нема много података о диверзитету врста куликоида и домаћинима на којима се хране у источној Европи. Истраживањем спроведеним у Румунији први пут је откривено присуство врста *C. griseidorsum*, *C. puncticollis* и *C. submaritimus*, а доказано је и да се куликоиде највише хране на преживарима што је у сагласности са другим истраживањима из Европе. Говеда би могла имати важну улогу у умножавању и ширењу патогена између дивљих и домаћих преживара (Tomazatos и сар., 2020).

Орбивируси

Вируси рода *Orbivirus*, чланови су породице *Reoviridae* која обухвата 14 родова. Тренутно у роду *Orbivirus* постоје 22 признате врсте и најмање 160 различитих серотипова заступљених широм света, претежно у тропским и суптропским зонама, укључујући Европу, Азију и Африку (Attoui и Mohd Jaafar, 2015). Орбивируси инфицирају кичмењаке и бескичмењаке, биљке и гљиве. Због свог утицаја на сточарство, вируси који изазивају болест плавог језика, епизоотску хеморагичну болест и кугу коња имају велики економски значај на глобалном нивоу (Hudson и сар., 2023). Ови дволанчани РНК вируси са десет сегмената су без омотача. Преношење орбивируса одвија се путем различитих артроподних вектора као што су комарци, мушице и крпељи, а припадници рода *Culicoides* преносе већину орбивируса који изазивају велике економске губитке код домаћих животиња. Због сегментисане структуре вируса, у случајевима коинфекције, може доћи до реасортирања гена или размене сегмената између врста орбивируса, што неизбежно утиче на пријемчиве домаћине, вируленцију, избегавање имунског одговора и антивирусну резистенцију. Реасортирање гена орбивируса игра важну улогу у настанку разноликости и еволуцији ове групе вируса. Пример за то је недавно откривени нови сој тибетског орбивируса у Кини за који је утврђено да је резултат природног реасортирања (Ren и сар., 2021). Болести изазване орбивирусима јављају се сезонски, углавном крајем лета, у суптропским и умереним регионима што је у вези са спољашњом температуром, активношћу вектора и репликацијом вируса (Guthrie и Weyer, 2015). Популација куликоида се повећава за време кишних периода (Aklilu и сар., 2014). Епизоотиологија орбивируса се мења под утицајем климатских промена које утичу на вирусе, векторе, али и пријемчиве животиње. Климатске промене могу потенцијално да погоршају негативан глобални економски утицај орбивируса.

Климатске промене, односно пораст просечне температуре ваздуха може довести до повећаног умножавања вируса, а самим тим и настанка нових мутација. Ширењем вектора на нове територије и инфекцијом вектора различитим серотиповима повећаће се и степен реасортирања вируса.

Болест плавог језика

Најзначајнија болест у Европи коју преносе куликоиде је болест плавог језика. Болест плавог језика је неконтагиозно обољење преживара (говеда, овце, јелени, козе и камиле), од кога најтеже оболе овце (MacLachlan и сар., 2009). Вирус припада роду *Orbivirus*, фамилији *Reoviridae*. До сада је описано 36 серотипова вируса који се разликују генетички али и по вируленцији (Ries и сар., 2021). Клиничка слика варира од благе до тешке. Код говеда болест обично протиче супклинички, али ова врста представља резервоар вируса зато што се код ње развија дуготрајна виремија (MacLachlan и сар., 2009). Вирус преносе куликоиде, са изузетком малог броја атипичних серотипова који се могу пренети директним контактом између преживара: неки сојеви овог вируса могу се пренети директно са животиње на животињу, и то трансплацентарно, јатрогено и оралним путем, па чак и механички, мувама које на свом усном апарату носе вирус. Ови путеви могу бити од значаја током периода „презимљавања“ вируса (Wilson и сар., 2008). Не постоји много доказа за вертикално преношење вируса болести плавог језика са једне генерације куликоида на следећу и сматра се да се вирусне честице не преносе на јаја што онемогућава трансоваријално преношење (Nunamaker и сар., 1990). У преживарима, вирус болести плавог језика би преко зиме могао опстати успостављањем хроничне или латентне инфекције или трансплацентарним преношењем са инфициране мајке на потомство и рађањем инфицираних младунаца у пролеће, што се доводи у везу са серотипом 8 (Mansfield и сар., 2024). Болест плавог језика се карактерише грозницом, поремећајем циркулације, хиперемијом усана, петехијама, улцерацијама на слузокожи носа и уста, појачаном саливацијом, едемом главе, отежаним дисањем, цијанозом језика и хромошћу, а могућ је и побачај. Промене могу бити израженије код младих животиња (Stevanović и Nedić, 2019; MacLachlan и сар., 2009). Економски утицај осим директних губитака у виду угинућа и абортуса, укључује и ограничење међународне трговине животињама и животињским производима. Вакцине су доступне, али се примењују рестриктивно осим у ситуацијама избијања обољења. Морбидитет и морталитет, трговинска ограничења и вакцинација подразумевају значајне трошкове и имају велики економски утицај на пољопривреднике и сточарску индустрију (Ђурић и сар., 2022; Ђурић и сар., 2021; Gethmann и сар., 2020).

Болест плавог језика је први пут описана почетком двадесетог века у јужној Африци. До средине двадесетог века болест се појавила у Северној Америци, а узрочник је идентификован 1952. године у САД (McKercher и сар., 1953). Крајем

1950. година болест плавог језика се јавила у јужној Азији (Пакистан, Индија, Кина, Индонезија, Малазија, Јапан) (Prasad и сар., 2009; Daniels и сар., 2009). Из Азије, ветром су пренети инфицирани вектори у Аустралију и први случајеви болести откривени су 1975. године (Firth и сар., 2017). У Европи су се први случајеви обољења појавили 1924. године, али веће епизоотије су се десиле на Кипру (1943.) и на Иберијском полуострву (1956.) (Gambles, 1949; Manso-Ribeiro и сар., 1957). Дистрибуција вируса се значајно променила у последње три деценије, што се огледа појавом вируса у регионима где до сада није био присутан, као и појавом нових серотипова у ензоотским подручјима (Mansfield и сар., 2024). Током прве половине двадесетог века, вирус болести плавог језика је био присутан у Африци и на Кипру, а 1951. године потврђен је и у Израелу; 1961. године у Азији, а затим, 1975. године у Аустралији (Wilson и Mellor, 2009). У Европи, 1956. и 1960. године, у Шпанији и Португалији избила је велика епизоотија изазвана серотипом 10, када је угинуло скоро 180.000 животиња (Manso-Ribeiro и сар., 1957). До краја двадесетог века, болест плавог језика се проширила и болест је пријављивана широм света у опсегу између приближно 40 степени северне и 35 степени јужне географске ширине (Wilson и Mellor, 2009). Серотип 9 је 1998. године откривен у Грчкој одакле се даље проширио на север и запад. До 1998. године, у Европи се болест плавог језика јављала спорадично, а сваку епизоотију пратио је један серотип вируса. Међутим, од 1998. године болест се проширила на север и Медитерански басен, а затим и Европу и проширила се 800 km северније (Purse и сар., 2005). Ширење вируса на нове територије последица је климатских промена које су повољно утицале на опстанак вируса током зиме и куликоиде, ширење *C. imicola* на север, али и пренос вируса аутохтоним врстама вектора. Активност вируса у Европи пре 2001. године је очигледно била ограничена на познати ареал *C. imicola*, а његово ширење на север, где *C. imicola* није присутна, представља прекретницу у епизоотиологији болести плавог језика у Европи и потврду да је преношење вируса од стране локалних врста куликоида могуће. У Републици Србији вирус је први пут изолован 2001. године и резултати су потврђени у референтној лабораторији Светске организације за здравље животиња у Пирбрајту, Уједињено Краљевство, где је установљено да се ради о серотипу 9 (Djurić и сар., 2004a), а присуство болести потврђено је и у другим земљама Балкана (Stevanović и сар., 2018; Djurić и сар., 2004b). У августу 2006., вирус болести плавог језика је по први пут прешао 50° северне географске ширине, а серотип 8 појавио се у Холандији, Белгији, Немачкој, Француској и Луксембургу (Kampen и Werner, 2023). Анализа секвенце генома вируса серотипа 8 указала је на велику сличност са сојем овог серотипа који је претходно изолован из подсахарске Африке (Maan и сар., 2008). Интересантно је да су лето и јесен 2006. године били најтоплији од почетка званичних мерења температуре ваздуха, а просечна температура ваздуха у Европи у јулу била је најтоплија забележена (Purse и сар., 2008). Институт

Фридрих Лефлер 2007. године је потврдио да је вирус успешно презимио на подручју западне Европе. Од 2006. године, болест плавог језика се проширила даље на северозападну Европу, заузимајући територије које се простиру до чак 58 степени северне географске ширине (Wilson и Mellor, 2009). Захваљујући програму обавезне вакцинације против болести плавог језика, серотип 8 је искорењен из Европе 2011. године, али се 2015. године, поново појавио у Француској, овога пута смањене вируленције, 2017. и у Швајцарској, а 2018. године у Немачкој, први пут након девет година (Niedbalski и Fitzner, 2020). Присуство серотипа 4 је 2014. године доказано у Шпанији, Португалији, Хрватској, Грчкој, Бугарској, Румунији, Словенији, а пар година касније, генски измењен, серотип 4 је откривен у Италији и Француској. У области Медитерана откривени су још и серотипови 1, 2 и 16. Серотип 3 је био присутан само на Сицилији и Сардинији, али након деценије статуса земље слободне од болести плавог језика, 2023. године потврђено је присуство овог серотипа у Холандији, када је дошло до испољавања клиничких симптома и угинућа оваца и говеда. Порекло и пут уношења вируса нису познати, као ни компетентна врста куликоида као вектора (Holwerda и сар., 2023). У Италији су обољевали мали преживари, док је болест код говеда углавном протицала супклинички. Међутим, у Холандији болест се брзо ширила и исти серотип 3 је изазвао тешку клиничку слику и висок леталитет оболелих оваца и говеда.

Неколико је могућих путева уношења болести плавог језика у земљу: увоз живих животиња путем легалне или илегалне трговине, увоз репродуктивног материјала, кретање дивљих животиња, преношење вектора ветром, уношење вектора превозним средствима или употреба атенуираних вакцина. Пут уношења вируса у Холандију је још увек нејасан, али сматра се да је у Италију серотип 3 унет инфицираним векторима који су ношени ветром из Туниса (Holwerda и сар., 2023). Под повољним метеоролошким условима куликоиде могу бити ношене ваздушним струјама на удаљености од 700 km изнад мора и 500 km копном (Eagles и сар., 2014; García-Lastra и сар., 2012). У својој студији Bibard и сар. (2024a), су процењивали ризик од уношења вируса болести плавог језика (серотип 3) ветром из Сардиније у континенталну Европу. Процењено је да је ризик од ширења вектора са Сардиније ограничен на Медитерански басен, углавном потенцијално захватајући југозападно подручје италијанског полуострва, Сицилију, Малту и Корзику, па чак и на северне и централне делове Италије, Балеарски архипелаг и континенталну Француску и Шпанију.

Епизоотска хеморагична болест

Епизоотска хеморагична болест је обољење домаћих и дивљих преживара изазвано вирусом епизоотске хеморагичне болести који припада роду *Orbivirus*. Епизоотска хеморагична болест је први пут описана 1955. године у Њу Џерсију, САД, када је оболео велики број белорепих јелена, а исте године је изолован

вирус, узрочник болести (MacLachlan и сар., 2015). Током наредних деценија вирус се проширио и на остале континенте (Jiménez-Cabello и сар., 2023). Вирус епизоотске хеморагичне болести, сродан је вирусу болести плавог језика, поседује двоструку РНК са десет сегмената, без омотача је и величине 80 nm. До данас је идентификовано седам серотипова вируса (1, 2, 4-8), а постоје још два, потенцијално нова серотипа откривена у Јужној Африци и Кини (Yang и сар., 2020). Обољење се јавља сезонски, од средине лета до касне јесени, у ензоотским подручјима на сваке 2 до 3 године, а епизоотије избијају на сваких 8 до 10 година. Разлике у овим циклусима могу се објаснити комбинованим ефектима имунитета популације, транспорта животиња и флукуација у популацији вектора (Becker и сар., 2024). Раширеност зависи од присуства и бројности куликоида, имунитета и осетљивости пријемчивих јединки. У ензоотским подручјима доводи до значајног морбидитета и морталитета јеленске дивљачи, која је веома пријемчива, а губици могу износити и до 90%. Иако су говеда нешто мање пријемчива и код њих болест обично протиче у субакутном току и у блажој форми, долази до губитака у млечној индустрији, а у последње две деценије све је више клиничких случајева обољења и код ове врсте животиња (Jiménez-Cabello и сар., 2023). Болест протиче у различитим формама у зависности од серотипа вируса: код белорепих јелена може протичати као асимптоматска, са благим симптомима па све до тешког хеморагичног обољења и угинућа (Avelino de Souza Santos и сар., 2023). Најчешћи симптоми епизоотске хеморагичне болести су: грозница, слабост, недостатак апетита, улцерације по слузокожи уста, појачана саливација, отежано гутање, осип по вимену, крварење, црвенило руба коже папака, отежано дисање, оток језика, егзофталмус, тахикардија, тахипнеја, увећани лимфни чворови, едем плућа, хромост, отежано кретање и стајање, а могућа су изненадна угинућа у року од 36 часова што се нарочито јавља код јелена. Код дивљих преживара може доћи и до појаве отока лица, дијареје са примесама крви и хематурије, дехидратације, хиперемije коњунктива. Веће епизоотије десиле су се у Јапану 1959. и 1997. године (Ohashi и сар., 1999), али последњих година све је већи број случајева обољења и у САД, Азији, Блиском Истоку, Северној Африци, медитеранским земљама (Jiménez-Cabello и сар., 2023). Иако се болест углавном јављала код дивљих преживара у САД (серотипови 1, 2 и 6), дошло је до појаве болести код говеда и у Азији (серотип 2 у Јапану), на Блиском истоку (серотип 7 у Израелу, 6 у Турској и Оману) и на северу Африке (серотип 6 у Тунису, Мароку, Алжиру). Серотип 8 је првобитно идентификован у Аустралији 1982. године и од тада није пријављено његово присуство ни у једној земљи све до краја 2021. године када су се појавили клинички случајеви код говеда у Тунису (Sghaier и сар., 2023). Болест се први пут појавила на територији Европе на Сардинији и у јужној Шпанији крајем 2022. године, а упркос забрани кретања животиња и појачаном надзору, и у Француској у септембру 2023. године. Серотип вируса из Италије генетички је идентичан

серотипу који води порекло из Туниса. Ова сличност серотипова указује на то да је вирус пренет из северне Африке у јужну Европу (Lorusso и сар., 2023). У неким деловима света постоје вакцине против серотипова 1, 2 и 6 (Kampen и Werner, 2023). Недостатак вакцине у Европи представља додатну претњу земљама слободним од ове болести.

Куга копитара

Куга коња је вирусна болест копитара која циркулише међу коњима, магарцима, зебрама и мазгама у ензоотским подручјима подсахарске Африке (Mellor и Hamblin, 2004). Узročник куге коња је *Orbivirus*, вирус без омотача, величине око 70 nm који поседује сегментирану дволанчану РНК. За сада, постоји девет серотипова вируса куге коња (Drolet и сар., 2022). На кугу коња пријемчиви су искључиво копитари. Болест је обично супклиничка код зебри и афричких магараца, при чему се зебре и други дивљи копитари сматрају природним резервоарима вируса (Zientara и сар., 2015). Код коња, болест се може манифестовати у три различита облика, са високом стопом морталитета која износи и до 90%. Куга коња се манифестује грозницом, едемом, знојењем, отежаним дисањем, нападима кашља, пенастим исцетком из ноздрва, отоком у пределу главе, крварењем и коликама (Carpenter и сар., 2017). Куга коња ензоотски се јавља у субсахарској Африци, али обољење се јављало и у северној Африци, на Блиском истоку, Индији и јужној Европи. Највеће забележене епизоотије десиле су се у Јужној Африци (17. век), када је угинуло 70.000 животиња, и на Блиском истоку (1959-1961.) када је угинуло 300.000 оболелих животиња (Carpenter и сар., 2017; Mellor и Hamblin, 2004). Први случајеви куге коња у југоисточној Азији, на Тајланду, пријављени су 2020. године (Bunpramong и сар., 2021). За контролу болести користе се атенуиране вакцине (Kampen и Werner, 2023) што не би био прихватљив сценарио у случају појаве болести у Европи.

ЗАКЉУЧАК

Након уношења инфицирних куликоида на нову територију неопходно је да се вектори адаптирају, а затим и убодом пренесу вирус пријемчивој врсти животиња или да увезене виремичне животиње дођу у контакт са довољно бројном популацијом аутохтоних куликоида како би пренос вируса био могућ. Климатске промене ће довести до експанзије болести изазваних орбивирусима и њихове појаве у земљама које су слободне од болести на тај начин што ће пораст просечних температура ваздуха утицати на ширење ареала вектора, продужење периода њихове активности, скраћење екстринзичног периода инкубације и олакшано презимљавање вируса. Управо овакав сценарио је забележен 2006. године када су измерене највише температуре ваздуха од почетка систематског бележења температуре и када је дошло до наглог ширења болести плавог језика.

Из угла превентиве и контроле, веома је важна едукација и обука ветеринара и фармера о клиничким манифестацијама болести изазваних орбивирусима, посебно оних које се обавезно пријављују и које се нису појављивале дуже време, јер многи ветеринари можда нису имали прилику да виде клиничке симптоме у својој пракси. С обзиром на то да не постоји адекватна терапија, а често ни ефикасне вакцине, требало би радити на развоју организационих, структурних и мера контроле вектора. Контрола арбовируса које преносе куликоиде зависи од више фактора као што су економски утицај обољења, могућности да арбовирус опстане на одређеној територији, постојање ефикасне вакцине, и може обухватати еутаназију, забрану кретања и трговине животињама, контролу бројности артропода, као и смањивање контаката пријемчивих животиња са биолошким векторима.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Уговор број 451-03-66/2024-03/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Aklilu N., Batten C., Gelaye E., Jenberie S., Ayelet G., Wilson A., Belay A., Asfaw Y., Oura C., Maan S., Bachanek-Bankowska K., Mertens P. P. C. (2014): African Horse Sickness Outbreaks Caused by Multiple Virus Types in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis*, 61:185-192.
- Attoui H., Mohd Jaafar F. (2015): Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev Sci Tech*, 34:353-361.
- Avelino de Souza Santos M., Rojas Gonzales J., Swanenburg M., Vidal G., Evans D., Horigan V., Betts J., La Ragione R., Horton D., Dórea F. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) – Systematic Literature Review report. *EFSA supporting publication*, 20(11):8027E, 43,
- Becker M., Gentry G., Husseneder C., Foil L. (2024): Seven-year prospective study on yearly incidence of Orbivirus infection of captive white-tailed deer and potential *Culicoides* vectors. *J Med Entomol.* 13;61(2):465-472.
- Bibard A., Martinetti D., Giraud A., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. (2024a): Quantitative risk assessment for the introduction of bluetongue virus into mainland Europe by long-distance wind dispersal of *Culicoides* spp.: A case study from Sardinia. *Risk Anal.*, 1-20.
- Bibard A., Martinetti D., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. (2024b): Assessing the Risk of Windborne Dispersal of *Culicoides* Midges in Emerging Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Outbreaks in France, *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-11.
-

- Bunpapong N., Charoenkul K., Nasamran C., Chamsai E., Udom K., Boonyapisitsopa S., Tantilertcharoen R., Kesdangsakon-wut S., Techakriengkrai N., Suradhat S., Thanawongnuwech R., Amonsin A. (2021): African horse sickness virus serotype 1 on horse farm, Thailand, 2020. *Emerg. Infect. Dis.*, 27(8):2208-2211.
- Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabrò A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale M., Mellor P. S. (2003): Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec.* 153(3):71-4.
- Carpenter S., Groschup M. H., Garros C., Felipe-Bauer M. L., Purse B. V. (2013): *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.*, 100(1):102-13.
- Carpenter S., Mellor P. S., Fall A. G., Garros C., Venter G. J. (2017): African horse sickness virus: History, transmission, and current status. *Annu. Rev. Entomol.*, 62:343-358.
- Daniels P., Lunt R., Prichard I. (2009): Bluetongue viruses in Australasia and East Asia. In *Bluetongue*. Eds. P. Mellor, M. Baylis, P. Mertens, Elsevier Academic Press, 223-234.
- Djuricic B., Jermolenko G., Milosević B., Radojčić S., Debeljak Z., Tomić A. (2004a): The first bluetongue virus isolation in Yugoslavia. *Vet Ital.*, 40(4):581-2.
- Djuricic B., Nedić D., Lausević D., Pavlović M. (2004b): The epizootiological occurrence of bluetongue in the central Balkans. *Vet Ital.*, 40(3):105-7.
- Drolet B. S., McGregor B. L., Cohnstaedt L. W., Wilson W. C., McVey D. S. (2022): Veterinary microbiology. In 63. *Reoviridae*. Eds. D.S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa, R. Wilkes, Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc., 679-692.
- Đurić S., Vejnović B., Janjić J., Teodorović R., Nikolić A., Nedić D., Mirilović M. (2021): "Cost-benefit" analiza pri pojavi bolesti plavog jezika kod domaćih preživara u Republici Srbiji. 32. Savetovanje veterinara Srbije, Zbornik radova, 64-72.
- Đurić S., Vejnović B., Nedić D., Teodorović R., Janjić J., Nikolić A., Mirilović M. (2022): Analiza troškova i dobiti modela za kontrolu i iskorenjivanje bolesti plavog jezika u Republici Srbiji. 27. Godišnje savetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina), Zbornik radova, 115-118.
- Eagles D., Melville L., Weir R., Davis S., Bellis G., Zalucki M. P., Walker P. J., Durr P. A. (2014): Long-distance aerial dispersal modelling of *Culicoides* biting midges: case studies of incursions into Australia. *BMC Vet Res*, 10(135).
- Firth C., Blasdel K. R., Amos-Ritchie R., Sendow I., Agnihotri K., Boyle D. B., Daniels P., Kirkland P. D., Walker P. J. (2017): Genomic analysis of bluetongue virus episystems in Australia and Indonesia. *Vet. Res.*, 48(1):82.
- Gambles R. M. (1949): Bluetongue of sheep in Cyprus. *J. Comp. Pathol.*, 59:176-190.
- García-Lastra, R., Leginagoikoa I., Plazaola J. M., Ocabo B., Aduriz G., Nunes T., Juste R. A. (2012): Bluetongue virus serotype 1 outbreak in the Basque Country
-

- (Northern Spain) 2007-2008. Data support a primary vector windborne transport. *PLoS ONE*, 7(3):e34421.
- Gethmann J., Probst C., Conraths F. J. (2020): Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. *Front. Vet. Sci.*, 7:65.
- Groschupp S., Kampen H., Werner D. (2023): Occurrence of putative Culicoides biting midge vectors (Diptera: Ceratopogonidae) inside and outside barns in Germany and factors influencing their activity. *Parasit Vectors*, 31;16(1):307.
- Guthrie A. J., Weyer C. T. (2015): African Horse sickness, Chapter 34. In Robinson's current therapy in equine medicine, 7th edition. Eds. K. A. Sprayberry, N. E. Robinson, Elsevier.
- Holwerda M., Santman-Berends I. M. G. A., Harders F., Engelsma M., Vloet R. P. M., Dijkstra E., van Gennip R. G. P., Mars M. H., Spierenburg M., Roos L., van den Brom R., van Rijn P. A. (2023): Emergence of Bluetongue Virus Serotype 3, the Netherlands, September 2023. *Emerg Infect Dis.*, 30(8):1552-1561.
- Hudson A. R., McGregor B. L., Shults P., England M., Silbernagel C., Mayo C., Carpenter M., Sherman T. J., Cohnstaedt L. W. (2023): Culicoides-borne Orbivirus epidemiology in a changing climate. *J Med Entomol.*, 14;60(6):1221-1229.
- Jiménez-Cabello L., Utrilla-Trigo S., Lorenzo G., Ortego J., Calvo-Pinilla E. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease Virus: Current Knowledge and Emerging Perspectives. *Microorganisms*, 11(5):1339.
- Kampen H., Werner D. (2023): Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Vectors of Viruses. *Microorganisms*, 11(11):2706.
- Lorusso A., Cappai S., Loi F., Pinna L., Ruii A., Puggioni G., Guercio A., Purpari G., Vicari D., Sghaier S., Zientara S., Spedicato M., Hammami S., Ben Hassine T., Portanti O., Breard E., Sailleu C., Ancora M., Di Sabatino D., Morelli D., Calistri P., Savini G. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis.*, 29(5):1063-1065.
- Maan S., Maan N. S., Ross-Smith N., Batten C. A., Shaw A. E., Anthony S. J., Samuel A. R., Darpel K. E., Veronesi E., Oura C. A., Singh K. P., Nomikou K., Portgieter A. C., Attoui H., van Rooij E., van Rijn P., De Clercq K., Vandebussche F., Zientara S., Breard E., Sailleu C., Beer M., Hoffman B., Mellor P. S., Mertens P. P. (2008): Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology*, 377:308-318.
- Maclachlan N. J., Drew C. P., Darpel K. E., Worwa G. (2009): The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.*, 141:1-16.
- Maclachlan N. J., Zientara S., Savini G., Daniels P. W. (2015): Epizootic haemorrhagic disease. *Rev. Sci. Tech.*, 34:341-351.
-

- Mansfield K. L., Schilling M., Sanders C., Holding M., Johnson N. (2024): Arthropod-Borne Viruses of Human and Animal Importance: Overwintering in Temperate Regions of Europe during an Era of Climate Change. *Microorganisms*, 12:1307.
- Manso-Ribeiro J., Rosa-Azevedo J., Noronha F., Braco-Forte-Junior M., Vasco-Fernandez M. (1957): Fievre catarrhale du mouton (bluetongue). *Bull. Off. Int. Epiz*, 48:350-367.
- McKercher D. G., McGowan B., Howarth J. A., Saito J. K. (1953): A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 122:300-301.
- Meiswinkel R., van Rijn P., Leijts P., Goffredo M. (2007): Potential new Culicoides vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec.*, 161:564-5.
- Mellor P. S., Boorman J., Baylis M. (2000): Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.*, 45:307-40.
- Mellor P. S., Hamblin C. (2004): African horse sickness. *Vet. Res.*, 35:445-66.
- Niedbalski W. I., Fitzner A. (2020): Recent changes in the global distribution of arboviral infections in ruminants. *Med. Weter*, 76(2):71-76.
- Nolan D. V., Carpenter S., Barber J., Mellor P. S., Dallas J. F., Mordue Luntz A. J., Pierniey S. B. (2007): Rapid diagnostic PCR assays for members of the Culicoides obsoletus and Culicoides pulicaris species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol.*, 124(1-2):82-94.
- Nunamaker R. A., Sieburth P. J., Dean V. C., Wigginton J. G., Nunamake, C. E., Mecham J. O. (1990): Absence of transovarial transmission of bluetongue virus in culicoides variipennis immunogold labeling of bluetongue virus-antigen in developing oocytes from Culicoides variipennis (Coquillett). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 96(1):19-31.
- Ohashi S., Yoshida K., Watanabe Y., Tsuda T. (1999): Identification and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3800-3803.
- Prasad G., Sreenivasulu D., Singh K. P., Mertens P. P. C., Maan S. (2009): Bluetongue in the Indian subcontinent. In Bluetongue. Eds. P. Mellor, M. Baylis, P. Mertens, Elsevier Academic Press, 167-195.
- Purse B. V., Brown H. E., Harrup L., Mertens P. P. C., Rogers D. J. (2008): Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *OIE Rev Sci Tech.*, 27(2):427-442.
- Purse B., Mellor P. S., Rogers D. J., Samuel A. R., Mertens P. P., Baylis M. (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:171-181.
- Ren N., Wang X., Liang M., Tian S., Ochieng C., Zhao L., Huang D., Xia Q., Yuan Z., Xia H. (2021): Characterization of a novel reassortment Tibet orbivirus isolated from Culicoides spp. in Yunnan, PR China. *J Gen Virol.*, 102(9):1-10.
-

- Ries C., Vögtlin A., Hüsey D., Jandt T., Gobet H., Hilbe M., Burgener C., Schweizer L., Häfliger-Speiser S., Beer M., Hoffmann B. (2021): Putative novel atypical BTV serotype '36' identified in small ruminants in Switzerland. *Viruses*, 13(5):721.
- Ruder M. G., Lysyk T. J., Stallknecht D. E., Foil L. D., Johnson D. J., Chase C. C., Dargatz D. A., Gibbs E. J. (2015): Transmission and epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in North America: current perspectives, research gaps, and future directions. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 15(6):348-363.
- Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M. A., Baldi L., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. (2005): Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletus Complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec.*, 157:133-9.
- Sghaier S., Silleanu C., Marcacci M., Thabet S., Curini V., Ben Hassine T., Teodori L., Portanti O., Hammami S., Jurisic L., Spedicato M., Postic L., Gazani I., Ben Osman R., Zientara S., Bréard E., Calistri P., Richt J. A., Holmes E. C., Savini G., Di Ciallonardo F., Lorusso A. (2023): Epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8 in Tunisia, 2021. *Viruses*, 15(1).
- Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: Description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.
- Stevanović O., Šević K., Marić J., Krneta D., Kasagić D., Nedić D. N., Sladojević Ž. (2018): Epidemiologija bolesti plavog jezika kod ovaca: rezultati sistematskog nadzora u Republici Srpskoj. 23. godišnje savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, 53-54.
- Tomazatos A., Jöst H., Schulze J., Spinu M., Schmidt-Chanasit J., Cadar D., Luhken R. (2020): Blood-meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a broad host range and new species records for Romania. *Parasites Vectors*, 13(79):2-12.
- Torina A., Caracappa S., Mellor P. S., Baylis M., Purse B. V. (2004): Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Med Vet Entomol.*, 18:81-9.
- Wellby M. P., Baylis M., Mellor P. S. (1996): Effect of temperature on survival and rate of virogenesis of African horse sickness virus in *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its significance in relation to the epidemiology of the disease. *Bull. Entomol. Res.*, 86:715-720.
- Wilson A. J., Mellor P. S. (2009): Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 364(1530):2669-81.
- Wilson A., Darpel K., Mellor P. S. (2008): Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLoS Biol.*, 6(8):e210.

- Winder, J. A. (1978): Cocoa flower Diptera: Their identity, pollinating activity and breeding sites. *Int. J. Pest. Manag.*, 24:5-18.
- Wittmann E. J., Mellor P. S., Baylis M. (2002). Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med. Vet. Entomol.*, 16:147-156.
- Yang H., Li Z., Wang J., Li Z., Yang Z., Liao D., Zhu J., Li H. (2020): Novel Serotype of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 26:3081-3083.
- Zientara S., Weyer C. T., Lecollinet S. (2015): African horse sickness. *Rev. Sci. Tech.*, 34:315-327.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401038S

UDK 616.988-036.22:595.42

Original Scientific Paper

CULICOIDES AS VECTORS OF ORBIVIRUSES, CAUSATIVE AGENTS OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIOUS DISEASES OF IMPORTANCE FOR VETERINARY MEDICINE

Nataša STEVIĆ*, Drago NEDIĆ, Sonja RADOJIČIĆ

University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

* Corresponding author: Nataša Stević, natasas@vet.bg.ac.rs

Summary

In the past, the worldwide distribution of bluetongue virus was limited to areas between approximately 35 degrees south and 40 degrees north latitude, but recently it has dramatically expanded in Europe to 58 degrees north latitude. The virus is thought to have been introduced into central and western Europe by the transport of infected animals or by wind-borne transmission of infected *Culicoides*, as well as by unknown routes of spread. Nowadays, European countries are experiencing regular outbreaks of bluetongue caused by different serotypes. Climate change is expected to affect the distribution and range of many vector species due to global warming and altered precipitation patterns. Climate change modifies long-term weather and climate patterns that affect the behavior of arthropod vectors. Increased average winter air temperatures allow arthropods to survive and extend their active period. An example of this is the emergence of bluetongue virus serotype 3 in the summer of 2023 in the Netherlands, the spread of the virus and its re-emergence in 2024. In the last 25 years, there has also been an increase in the number of horse sickness serotypes circulating at the northern border of the virus in sub-Saharan Africa. The current situation of equine sickness resembles the distribution of bluetongue virus before the sudden expansion into northern Europe in 2006. The wind-borne transmission of infected *Culicoides* is particularly important from a control perspective, as it makes the restriction of movement of susceptible animals significantly less effective in preventing the spread of the disease. Currently, the most important role of *Culicoides* from a public health perspective is their ability as biological vectors to transmit *Oropouche* virus, the causative agent of Oropouche fever in humans.

Key words: climate change, culicoids, orbiviruses, ruminants, vectors.

INTRODUCTION

During the past three decades, an increasing number of arbovirus infections has been seen. This has been attributed to climate change, mainly caused by human activities, which favors the emergence and spread of arthropods to new territories, as well as the

resistance and transmission of viruses. Diseases caused by arboviruses that can endanger a country are a threat to human and animal health, with potentially devastating social and economic consequences, and urbanization, globalization and climate change in recent years have led to the expansion of arboviruses. The global distribution of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in the world has changed significantly in recent years, especially due to the introduction of multiple serotypes of bluetongue virus into Europe. The unexpected emergence of bluetongue or epizootic hemorrhagic disease is related to the potential consequences of climate change on the geographical distribution and severity of vector-borne diseases. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses infect domestic and wild ruminants and cause clinically almost identical changes. Symptoms include swelling and cyanosis of the tongue, coronitis of the hoof, bleeding and death. Cattle are considered reservoirs for bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses, because infected animals, although usually asymptomatic, are viremic. The enormous genetic diversity of these orbiviruses can lead to the emergence of new serotypes with unique biological properties, as well as the possibility of not only horizontal but also vertical transmission.

Different species of Culicoides are the primary vectors of arboviruses in different parts of the world. Hematophagous insects of the genus Culicoides are distributed throughout the world and in some regions can reach high numbers seasonally, which affects livestock farming, agriculture, forestry and tourism in many parts of the world, leading to great economic losses. Most species of Culicidae are hematophagous, feeding on all vertebrates, including humans. In addition to being unpleasant to bite, Culicidae can transmit viruses, protozoa and nematodes during feeding, with some viruses causing high morbidity and mortality in ruminants, horses and humans. Their greatest importance for veterinary medicine is reflected in the fact that they transmit numerous pathogens of domestic and wild animals, especially orbiviruses, which cause non-contagious diseases of ruminants. They are primary vectors of Orbiviruses (bluetongue virus, epizootic haemorrhagic disease virus and African horse sickness virus), *Orthobunyaviruses*, *Oropouche*, *Akabane* and *Schmallenberg* viruses.

There are several routes of introduction of arboviruses that carry Culicidae to new territories, such as wind-borne transmission of infected Culicidae, import of viremic animals, use of unregistered attenuated vaccines (emergence of bluetongue virus serotypes 6 and 11 in Europe). The routes of introduction of bluetongue virus serotypes 8 and 25 are currently unknown. It is assumed that serotype 8 was introduced by the transport of infected Culicidae, animals and humans, or even by the import of cut flowers. Transport by ship is also potentially possible. However, it should be emphasized that Culicidae eggs are very sensitive to desiccation, so their transport is not a likely route of introduction of the virus into a country. The presence of the low-virulent serotype 25 of the bluetongue virus (*Toggenburg* virus) was "incidentally"

detected during routine surveillance of the highly pathogenic serotype 8 in Switzerland (Carpenter et al., 2013).

Vector-borne viruses have mechanisms for “overwintering” during periods of low temperatures to survive during the winter months when vectors are inactive. Mechanisms for virus survival in Europe include overwintering in “long-lived” insects, prolonged viremia in ruminants, and vertical transmission between ruminants and vectors. It should also be noted that climate change affects vectors, their competence, virus transmission capacity, geographic distribution, extrinsic incubation period, duration of activity (late autumn, early spring), and also the virus genome (Hudson et al., 2023).

Culicoides

Insects of the family *Ceratopogonidae* are distributed throughout the world. There are 6,206 species of *Ceratopogonidae* in the world. Within the family *Ceratopogonidae*, there are four genera that feed on the blood of vertebrates (*Culicoides*, *Leptoconops*, *Lasiohelea* and *Austroconops*), of which the genus *Culicoides*, with 1,347 described species, is of greatest importance when it comes to infectious diseases. To date, over 50 arboviruses have been isolated from these insects, 45% of which have not been detected in other arthropods (Mellor et al., 2000). These insects are potential vectors of infectious disease agents, the most important of which are bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus, Schmallenberg virus, African horse sickness virus, as well as *Oropouche* virus, the only known virus transmitted by *Culicoides* to humans. *Culicidae* are some of the smallest hematophagous insects, rarely exceeding three millimeters in length. The life cycle consists of an egg, four larval stages, a pupa, and an adult. The larvae are very diverse in habit, behavior, and ecology, and develop in moist habitats. Adults can also be important pollinators. Females require a protein diet to produce eggs. They are active at dusk and dawn. They are present in most parts of the world, with the exception of Antarctica and New Zealand. For the development of eggs, larvae, and pupae, they require moisture-rich habitats, such as moist, organically enriched soil, which is often found around farms, and can also be found in places such as tree cracks, rotting vegetation, pond edges, wet soils, and certain types of herbivorous dung. Due to their size (1-2.5 mm), under favorable conditions, *Culicoids* can easily be carried by winds over long distances. *Culicoids* have also been shown to be present at high altitudes. Epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8 is thought to have been introduced into Italy from Tunisia in this way, by wind-borne vectors, which is the same route of transmission as bluetongue virus serotype 3 in 2017. Research on the spread of *Culicoids* by wind has shown that the high-risk zone of wind-borne vector spread from the sites of the first outbreaks of Epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8 in France remains largely confined to the south-west of the country, but with possible penetration northwards to the Gironde region or eastwards along the Pyrenees mountains. In addition, the spread of the vector towards northern

Spain is possible (Bibard et al., 2024b). While climate change may affect the future spread of infected vectors by wind, the transport of infected animals is a more likely route of introduction of orbiviruses into a country and region that has disease-free status. The emergence of African horse sickness in the Middle East and Southwest Asia from 1959 to 1962 and in North Africa and Spain in 1965 was due to the movement of nomadic tribes (Carpenter et al., 2017). The import of zebras from Namibia into Spain in 1987 also introduced serotype 4 of the African horse sickness virus, and in 2020, serotype 1 was introduced into Thailand through the import of equidae.

The ability of hematophagous insects to be vectors of pathogens is innate and genetically determined. It is a consequence of the evolutionary adaptation of the pathogen during which it acquired the ability to evade the immune defenses of the arthropod, infect the vector, multiply and develop in its cells and organs, reach the salivary glands and transmit to the susceptible species during feeding of the vector. Four criteria must be met to determine the vectorial ability of arthropods for different pathogens: confirmation of the virus in vectors caught in the field that have not taken a blood meal, demonstrate the ability to become infected after feeding on an infected host or blood containing the pathogen, establish the ability to transmit the pathogen to the host by biting, and determine the abundance and association of vectors in the field with appropriate susceptible hosts (Ruder et al., 2015).

Culicoids are biological vectors of orbiviruses, which means that after ingestion, the virus infects the midgut cells of these insects and multiplies there, travels to the body cavity of the insect, and then infects the salivary glands, where it also multiplies. Only then can the virus be transmitted to a new host. The time that elapses from the ingestion of the virus until it reaches the salivary glands of the vector is called the extrinsic incubation period, and its duration depends on the activity of the viral RNA polymerase, which, in turn, depends on the ambient temperature. At 15°C, the extrinsic incubation period lasts several weeks, while at 30°C it lasts only a few days (Wittmann et al., 2002). After feeding on the Culicoids and taking a meal of infectious blood, the bluetongue virus enters the midgut, multiplies and can infect other organs. At 25°C, the virus from the midgut reaches the salivary glands within two days of infection. After entry into the acinar cells of the salivary glands, the virus replicates again, and then the virus particles are released into the terminal acini from where they can be transmitted in the saliva during the vector bite. In contrast to mammalian cells, which are severely damaged by the process of virus exit by exocytosis, virus release from insect cells occurs exclusively by membrane budding (Kampen and Werner, 2023). The time required for the vector to digest a blood meal also decreases at higher temperatures, increasing the frequency of feeding. At temperatures below 12°C, viral replication ceases completely, although the virus can survive in infected Culicoides and resume replication if the temperature increases (Wellby et al., 1996). At such low temperatures, vector activity also decreases. As a result, virus transmission is almost completely interrupted for several months of the year due to cold weather. However, epizootics

often continue after periods far longer than the typical lifespan of the adult vector or the normal infectivity period of the host. During the winter months, arthropods are inactive, and Culicoides are thought to overwinter in the larval stage. During the winter in Europe, after the first frosts, adult Culicoides are present in small numbers or completely absent. A study in Germany showed that Culicoides of the *Obsoletus* group are present almost all year round inside stables, indicating a high risk of virus transmission to ruminants in closed environments. In this study, the *Obsoletus* group was active both indoors and outdoors during all months of the year. Some species of the *Pulicaris* complex were active from March, but were also present during the cold months until early December. Therefore, the results show that there are periods of low vector activity during the year, but not without vectors (Groschupp et al., 2023). The resistance of *C. sonorensis* to temperatures of -20°C and significant desiccation in the egg stage may indicate resistance to climate change in the future.

Studies indicate that the same species of Culicoides are involved in the transmission of bluetongue, epizootic haemorrhagic disease and African horse sickness. Of all Culicoides species, *Culicoides imicola* is the most important vector worldwide. It is present throughout Africa, the Near and Middle East, parts of South and Southeast Asia and southern Europe. The most important vector globally, *C. imicola*, has so far been discovered only in Mediterranean countries, and the northernmost part of Europe where it is present is southern Switzerland (Groschupp et al., 2023). Also, another important vector in Africa, south of the Sahara, is *C. bolitinos*, a species related to the *Imicola* complex. In North America, the main vector is *C. sonorensis* and is the best studied Ceratopogonid species. In Central and South America, it is *C. insignis*, and in Australia, *C. brevitarsis* (Winder, 1978). At the end of the twentieth century, it was assumed that the native Culicoidea species that are widespread and numerous throughout northern Europe, *C. obsoletus* and *C. pulicaris*, could also be competent vectors. This was definitively established in 2006, when bluetongue disease broke out in central and northern Europe and when the presence of *C. imicola* was not detected, but only the presence of *C. obsoletus* and *C. pulicaris* (Kampen and Werner, 2023). Until the 2006 outbreak of bluetongue in central and northern Europe, the virus was mainly found in Africa, Asia and the southern part of Europe, where it was primarily transmitted by the species *C. imicola*. The outbreak of bluetongue disease in central and northern Europe, where *C. imicola* is not present, suggests that local Culicoidea species are also competent biological vectors (Meiswinkel et al., 2007). Four members of the *Obsoletus* group of the genus *Culicoides* (*Culicoides obsoletus sensu stricto*, *Culicoides scoticus*, *Culicoides dewulf*, *Culicoides chiopterus*) and three members of the *Pulicaris* complex (*Culicoides pulicaris sensu stricto*, *Culicoides punctatus*, *Culicoides impunctatus*) were considered to have a potential role as vectors (Nolan et al., 2007; Savini et al., 2005; Torina et al., 2004; Caracappa et al., 2003). There is little information on the diversity of Culicoidea species and their host populations in Eastern Europe. A study conducted in Romania revealed for the first time the presence of the species *C.*

griseidorsum, *C. puncticollis* and *C. submaritimus*, and it was also proven that *Culicoides* feed mainly on ruminants, which is in agreement with other studies from Europe. Cattle could play an important role in the multiplication and spread of pathogens between wild and domestic ruminants (Tomazatos et al., 2020).

Orbiviruses

Orbiviruses are members of the *Reoviridae* family, which includes 14 genera. There are currently 22 recognized species and at least 160 different serotypes in the genus *Orbivirus*, distributed worldwide, predominantly in tropical and subtropical regions, including Europe, Asia, and Africa (Attoui and Mohd Jaafar, 2015). Orbiviruses infect vertebrates and invertebrates, plants, and fungi. Due to their impact on livestock, the viruses that cause bluetongue, epizootic hemorrhagic disease, and African horse sickness are of great economic importance globally (Hudson et al., 2023). These ten-segmented, double-stranded RNA viruses are non-enveloped. Orbiviruses are transmitted by various arthropod vectors such as mosquitoes, flies, and ticks, and members of the genus *Culicoides* transmit most orbiviruses that cause major economic losses in domestic animals. Due to the segmented structure of the virus, in cases of co-infection, gene reassortment or segment exchange between orbivirus species may occur, which inevitably affects susceptible hosts, virulence, immune evasion, and antiviral resistance. Orbivirus gene reassortment plays an important role in the emergence of diversity and evolution of this group of viruses. An example of this is the recently discovered new strain of Tibetan orbivirus in China, which was found to be the result of natural reassortment (Ren et al., 2021). Diseases caused by orbiviruses occur seasonally, mainly in late summer, in subtropical and temperate regions, which is related to external temperature, vector activity and virus replication (Guthrie and Weyer, 2015). The population of Culicidae increases during rainy periods (Aklilu et al., 2014). The epizootiology of orbiviruses is changing under the influence of climate change that affects viruses, vectors, but also susceptible animals. Climate change can potentially worsen the negative global economic impact of orbiviruses. Climate change, i.e. an increase in average air temperature, can lead to increased virus replication, and thus the emergence of new mutations. The spread of vectors to new territories and the infection of vectors with different serotypes will also increase the degree of virus reassortment.

Blue tongue disease

The most important disease in Europe transmitted by Culicidae is bluetongue. Bluetongue is a non-contagious disease of ruminants (cattle, sheep, deer, goats and camels), with sheep being the most severely affected (Maclachlan et al., 2009). The virus belongs to the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*. So far, 36 serotypes of the virus have been described, which differ genetically and in virulence (Ries et al., 2021). The clinical picture varies from mild to severe. In cattle, the disease usually proceeds

subclinically, but this species represents a reservoir of the virus because it develops long-term viremia (MacLachlan et al., 2009). The virus is transmitted by Culicidae, with the exception of a small number of atypical serotypes that can be transmitted by direct contact between ruminants: some strains of this virus can be transmitted directly from animal to animal, transplacentally, iatrogenically and orally, and even mechanically, by flies carrying the virus on their mouth. These routes may be important during the “overwintering” period of the virus (Wilson et al., 2008). There is little evidence for vertical transmission of bluetongue virus from one generation of Culicidae to the next, and it is thought that virus particles are not transferred to eggs, which precludes transovarial transmission (Nunamaker et al., 1990). In ruminants, bluetongue virus may persist over the winter by establishing a chronic or latent infection or by transplacental transmission from infected dams to offspring and giving birth to infected young in the spring, which has been linked to serotype 8 (Mansfield et al., 2024). Bluetongue is characterized by fever, circulatory disorders, lip hyperemia, petechiae, ulcerations of the nasal and oral mucosa, increased salivation, head edema, difficulty breathing, cyanosis of the tongue, and lameness, and abortion is possible. The changes may be more pronounced in young animals (Stevanović and Nedić, 2019; MacLachlan et al., 2009). The economic impact, in addition to direct losses in the form of mortality and abortion, also includes restrictions on international trade in animals and animal products. Vaccines are available, but are used restrictively except in outbreak situations. Morbidity and mortality, trade restrictions, and vaccination are significant costs and have a major economic impact on farmers and the livestock industry (Đurić et al., 2022; Đurić et al., 2021; Gethmann et al., 2020).

Bluetongue was first described in the early 20th century in southern Africa. By the mid-20th century, the disease had spread to North America, and the causative agent was identified in 1952 in the USA (McKercher et al., 1953). In the late 1950s, bluetongue was reported in southern Asia (Pakistan, India, China, Indonesia, Malaysia, Japan) (Prasad et al., 2009; Daniels et al., 2009). From Asia, wind-borne infected vectors were introduced to Australia, and the first cases of the disease were detected in 1975 (Firth et al., 2017). In Europe, the first cases of the disease appeared in 1924, but major epizootics occurred in Cyprus (1943) and the Iberian Peninsula (1956) (Gambles, 1949; Manso-Ribeiro et al., 1957). The distribution of the virus has changed significantly in the last three decades, as reflected by the appearance of the virus in regions where it was previously absent, as well as the emergence of new serotypes in enzootic areas (Mansfield et al., 2024). During the first half of the twentieth century, bluetongue virus was present in Africa and Cyprus, and in 1951 it was confirmed in Israel; in 1961 in Asia, and then, in 1975 in Australia (Wilson and Mellor, 2009). In Europe, in 1956 and 1960, a major epizootic caused by serotype 10 occurred in Spain and Portugal, killing almost 180,000 animals (Manso-Ribeiro et al., 1957). By the end of the twentieth century, bluetongue had spread and was reported worldwide between approximately 40 degrees north and 35 degrees south latitude (Wilson and Mellor, 2009). Serotype 9

was discovered in Greece in 1998, from where it spread further north and west. Until 1998, bluetongue occurred sporadically in Europe, with each epizootic being associated with a single serotype of the virus. However, since 1998, the disease has spread northwards and into the Mediterranean region, and then into Europe, extending 800 km northwards (Purse et al., 2005). The spread of the virus to new territories is a consequence of climate change that has favoured the survival of the virus during the winter and the Culicoidea, the spread of *C. imicola* northwards, but also the transmission of the virus by native vector species. The activity of the virus in Europe before 2001 was apparently limited to the known range of *C. imicola*, and its spread northwards, where *C. imicola* is not present, represents a turning point in the epizootiology of bluetongue in Europe and confirmation that virus transmission by local Culicoidea species is possible. In the Republic of Serbia, the virus was first isolated in 2001 and the results were confirmed in the World Organisation for Animal Health reference laboratory in Pirbright, United Kingdom, where it was determined to be serotype 9 (Djuricic et al., 2004a), and the presence of the disease has also been confirmed in other Balkan countries (Stevanović et al., 2018; Djuricic et al., 2004b). In August 2006, the bluetongue virus crossed 50° north latitude for the first time, and serotype 8 appeared in the Netherlands, Belgium, Germany, France and Luxembourg (Kampen and Werner, 2023). Analysis of the genome sequence of the serotype 8 virus indicated a high similarity to a strain of this serotype previously isolated from sub-Saharan Africa (Maan et al., 2008). Interestingly, the summer and autumn of 2006 were the warmest since official temperature records began, and the average air temperature in Europe in July was the warmest on record (Purse et al., 2008). In 2007, the Friedrich Loeffler Institute confirmed that the virus had successfully overwintered in western Europe. Since 2006, bluetongue has spread further into northwestern Europe, occupying areas as far north as 58 degrees north latitude (Wilson and Mellor, 2009). Thanks to a mandatory vaccination program against bluetongue, serotype 8 was eradicated from Europe in 2011, but in 2015, it reappeared in France, this time with reduced virulence, in 2017 in Switzerland, and in 2018 in Germany, for the first time in nine years (Niedbalski and Fitzner, 2020). The presence of serotype 4 was proven in 2014 in Spain, Portugal, Croatia, Greece, Bulgaria, Romania, Slovenia, and a few years later, a genetically modified serotype 4 was discovered in Italy and France. Serotypes 1, 2 and 16 have also been detected in the Mediterranean region. Serotype 3 was present only in Sicily and Sardinia, but after a decade of bluetongue-free status, the presence of this serotype was confirmed in the Netherlands in 2023, when clinical symptoms and deaths occurred in sheep and cattle. The origin and route of introduction of the virus are unknown, as is the competent species of Culicidae as a vector (Holwerda et al., 2023). In Italy, small ruminants were affected, while the disease in cattle was mainly subclinical. However, in the Netherlands, the disease spread rapidly and the same serotype 3 caused a severe clinical picture and high mortality in affected sheep and cattle.

There are several possible routes of introduction of bluetongue into the country: import of live animals through legal or illegal trade, import of reproductive material, movement of wild animals, wind-borne vectors, introduction of vectors by means of transport or use of attenuated vaccines. The route of introduction of the virus into the Netherlands is still unclear, but it is thought that serotype 3 was introduced into Italy by infected vectors carried by the wind from Tunisia (Holwerda et al., 2023). Under favourable meteorological conditions, *Culicoides* can be carried by air currents over distances of up to 700 km over sea and 500 km over land (Eagles et al., 2014; García-Lastra et al., 2012). In their study, Bibard et al. (2024a), assessed the risk of wind-borne introduction of bluetongue virus (serotype 3) from Sardinia to continental Europe. The risk of vector spread from Sardinia was estimated to be limited to the Mediterranean region, mainly potentially affecting the southwestern area of the Italian peninsula, Sicily, Malta and Corsica, and even northern and central Italy, the Balearic Islands and continental France and Spain.

Epizootic hemorrhagic disease

Epizootic hemorrhagic disease is a disease of domestic and wild ruminants caused by the epizootic hemorrhagic disease virus belonging to the genus *Orbivirus*. Epizootic hemorrhagic disease was first described in 1955 in New Jersey, USA, when a large number of white-tailed deer were affected, and the virus causing the disease was isolated in the same year (Maclachlan et al., 2015). Over the following decades, the virus spread to other continents (Jiménez-Cabello et al., 2023). Epizootic hemorrhagic disease virus, related to bluetongue virus, has a double-stranded RNA with ten segments, is non-enveloped and 80 nm in size. To date, seven serotypes of the virus have been identified (1, 2, 4-8), and there are two more, potentially new serotypes discovered in South Africa and China (Yang et al., 2020). The disease occurs seasonally, from mid-summer to late autumn, in enzootic areas every 2 to 3 years, and epizootics occur every 8 to 10 years. Differences in these cycles can be explained by the combined effects of population immunity, animal transport and fluctuations in the vector population (Becker et al., 2024). The prevalence depends on the presence and abundance of *Culicidae*, the immunity and susceptibility of susceptible individuals. In enzootic areas, it causes significant morbidity and mortality in deer, which are highly susceptible, and losses can be up to 90%. Although cattle are somewhat less susceptible and the disease usually has a subacute course and a milder form, losses occur in the dairy industry, and in the last two decades there has been an increasing number of clinical cases of the disease in this species of animals (Jiménez-Cabello et al., 2023). The disease occurs in different forms depending on the serotype of the virus: in white-tailed deer it can occur as asymptomatic, with mild symptoms, up to severe hemorrhagic disease and death (Avelino de Souza Santos et al., 2023). The most common symptoms of epizootic hemorrhagic disease are: fever, weakness, lack of appetite, ulcerations of the oral mucosa, increased salivation, difficulty swallowing,

rash on the udder, bleeding, redness of the hoof skin, difficulty breathing, swelling of the tongue, exophthalmos, tachycardia, tachypnea, enlarged lymph nodes, pulmonary edema, lameness, difficulty moving and standing, and sudden deaths within 36 hours are possible, which occurs especially in deer. In wild ruminants, facial swelling, bloody diarrhea and hematuria, dehydration, and conjunctival hyperemia may also occur. Major epizootics occurred in Japan in 1959 and 1997 (Ohashi et al., 1999), but in recent years there has been an increasing number of cases in the USA, Asia, the Middle East, North Africa, and Mediterranean countries (Jiménez-Cabello et al., 2023). Although the disease has mainly occurred in wild ruminants in the USA (serotypes 1, 2, and 6), the disease has also occurred in cattle in Asia (serotype 2 in Japan), the Middle East (serotype 7 in Israel, 6 in Turkey and Oman), and North Africa (serotype 6 in Tunisia, Morocco, and Algeria). Serotype 8 was originally identified in Australia in 1982 and has not been reported in any country since then until late 2021 when clinical cases appeared in cattle in Tunisia (Sghaier et al., 2023). The disease first appeared in Europe in Sardinia and southern Spain in late 2022 and, despite a ban on animal movements and increased surveillance, in France in September 2023. The serotype of the virus from Italy is genetically identical to the serotype originating in Tunisia. This similarity of serotypes suggests that the virus was transmitted from North Africa to Southern Europe (Lorusso et al., 2023). Vaccines against serotypes 1, 2 and 6 are available in some parts of the world (Kampen and Werner, 2023). The lack of a vaccine in Europe poses an additional threat to countries free of this disease.

African horse sickness

African horse sickness is a viral disease of equidae that circulates among horses, donkeys, zebras and mules in enzootic areas of sub-Saharan Africa (Mellor and Hamblin, 2004). The causative agent of African horse sickness is *Orbivirus*, a non-enveloped virus of approximately 70 nm in size that possesses segmented double-stranded RNA. To date, there are nine serotypes of African horse sickness virus (Drolet et al., 2022). Only equidae are susceptible to African horse sickness. The disease is usually subclinical in zebras and African donkeys, with zebras and other wild ungulates considered natural reservoirs of the virus (Zientara et al., 2015). In horses, the disease can manifest in three different forms, with a high mortality rate of up to 90%. African horse sickness is manifested by fever, edema, sweating, difficulty breathing, coughing fits, frothy nasal discharge, swelling in the head, bleeding, and colic (Carpenter et al., 2017). African horse sickness occurs enzootically in sub-Saharan Africa, but the disease has also occurred in North Africa, the Middle East, India, and southern Europe. The largest recorded epizootics occurred in South Africa (17th century), when 70,000 animals died, and in the Middle East (1959-1961), when 300,000 infected animals died (Carpenter et al., 2017; Mellor and Hamblin, 2004). The first cases of African horse sickness in Southeast Asia, in Thailand, were reported in 2020 (Bunpapong et al.,

2021). Attenuated vaccines are used to control the disease (Kampen and Werner, 2023), which would not be an acceptable scenario in the event of an outbreak in Europe.

CONCLUSION

After the introduction of infectious Culicoids into a new territory, it is necessary for the vectors to adapt and then transmit the virus to a susceptible animal species by biting, or for the imported viremic animals to come into contact with a sufficiently large population of indigenous Culicoids to make virus transmission possible. Climate change will lead to the expansion of diseases caused by orbiviruses and their occurrence in countries that are free from the disease in such a way that the increase in average air temperatures will affect the expansion of the vector's range, prolonging the period of their activity, shortening the extrinsic incubation period and facilitating the overwintering of the virus. This is exactly the scenario that was recorded in 2006, when the highest air temperatures since the beginning of systematic temperature recording were measured and when there was a sudden spread of bluetongue disease. From a prevention and control perspective, it is very important to educate and train veterinarians and farmers about the clinical manifestations of diseases caused by orbiviruses, especially those that are notifiable and have not appeared for a long time, as many veterinarians may not have had the opportunity to see clinical symptoms in their practice. Given that there is no adequate therapy, and often no effective vaccine, efforts should be done to develop organizational, structural and vector control measures. Control of arboviruses transmitted by Culicoides depends on several factors such as the economic impact of the disease, the possibility of the arbovirus surviving in a certain territory, the existence of an effective vaccine, and may include euthanasia, bans on the movement and trade of animals, control of the number of arthropods, as well as reducing contacts of susceptible animals with biological vectors.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (contract No. 451-03-66/2024-03/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Aklilu N., Batten C., Gelaye E., Jenberie S., Ayelet G., Wilson A., Belay A., Asfaw Y., Oura C., Maan S., Bachanek-Bankowska K., Mertens P. P. C. (2014): African Horse Sickness Outbreaks Caused by Multiple Virus Types in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis*, 61:185-192.
- Attoui H., Mohd Jaafar F. (2015): Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev Sci Tech*, 34:353-361.
-

- Avelino de Souza Santos M., Rojas Gonzales J., Swanenburg M., Vidal G., Evans D., Horigan V., Betts J., La Ragione R., Horton D., Dórea F. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) – Systematic Literature Review report. *EFSA supporting publication*, 20(11):8027E, 43,
- Becker M., Gentry G., Husseneder C., Foil L. (2024): Seven-year prospective study on yearly incidence of Orbivirus infection of captive white-tailed deer and potential Culicoides vectors. *J Med Entomol.* 13;61(2):465-472.
- Bibard A., Martinetti D., Giraud A., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. (2024a): Quantitative risk assessment for the introduction of bluetongue virus into mainland Europe by long-distance wind dispersal of Culicoides spp.: A case study from Sardinia. *Risk Anal.*, 1-20.
- Bibard A., Martinetti D., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. (2024b): Assessing the Risk of Windborne Dispersal of *Culicoides* Midges in Emerging Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Outbreaks in France, *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-11.
- Bunpapong N., Charoenkul K., Nasamran C., Chamsai E., Udom K., Boonyapisitsopa S., Tantilertcharoen R., Kesdangsakon-wut S., Techakriengkrai N., Suradhat S., Thanawongnuwech R., Amonsin A. (2021): African horse sickness virus serotype 1 on horse farm, Thailand, 2020. *Emerg. Infect. Dis.*, 27(8):2208-2211.
- Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabrò A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale M., Mellor P. S. (2003): Identification of a novel bluetongue virus vector species of Culicoides in Sicily. *Vet Rec.*, 153(3):71-4.
- Carpenter S., Groschup M. H., Garros C., Felipe-Bauer M. L., Purse B. V. (2013): Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.*, 100(1):102-13.
- Carpenter S., Mellor P. S., Fall A. G., Garros C., Venter G. J. (2017): African horse sickness virus: History, transmission, and current status. *Annu. Rev. Entomol.*, 62:343-358.
- Daniels P., Lunt R., Prichard I. (2009): Bluetongue viruses in Australasia and East Asia. In *Bluetongue*. Eds. P. Mellor, M. Baylis, P. Mertens, Elsevier Academic Press, 223-234.
- Djuricic B., Jermolenko G., Milosević B., Radojčić S., Debeljak Z., Tomić A. (2004a): The first bluetongue virus isolation in Yugoslavia. *Vet Ital.*, 40(4):581-2.
- Djuricic B., Nedić D., Lausević D., Pavlović M. (2004b): The epizootiological occurrence of bluetongue in the central Balkans. *Vet Ital.*, 40(3):105-7.
- Drolet B. S., McGregor B. L., Cohnstaedt L. W., Wilson W. C., McVey D. S. (2022): Veterinary microbiology. In 63. Reoviridae. Eds. D.S. McVey, M. Kennedy, M. M. Chengappa, R. Wilkes, Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc., 679-692.
- Đurić S., Vejnović B., Janjić J., Teodorović R., Nikolić A., Nedić D., Mirilović M. (2021): "Cost-benefit" analysis of bluetongue disease in domestic ruminants in
-

- the Republic of Serbia. In 32. Conference of Serbian Veterinarians, Proceedings, 64-72.
- Đurić S., Vejnović B., Nedić D., Teodorović R., Janjić J., Nikolić A., Mirilović M. (2022): Analysis of costs and benefits of the model for the control and eradication of bluetongue in the Republic of Serbia. In 27. Anniversary Annual Counselling of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (Bosnia and Heryegovina) with international participation, Proceedings, 115-118.
- Eagles D., Melville L., Weir R., Davis S., Bellis G., Zalucki M. P., Walker P. J., Durr P. A. (2014): Long-distance aerial dispersal modelling of *Culicoides* biting midges: case studies of incursions into Australia. *BMC Vet Res*, 10(135).
- Firth C., Blasdell K. R., Amos-Ritchie R., Sendow I., Agnihotri K., Boyle D. B., Daniels P., Kirkland P. D., Walker P. J. (2017): Genomic analysis of bluetongue virus episystems in Australia and Indonesia. *Vet. Res.*, 48(1):82.
- Gambles R. M. (1949): Bluetongue of sheep in Cyprus. *J. Comp. Pathol.*, 59:176-190.
- García-Lastra, R., Leginagoikoa I., Plazaola J. M., Ocabo B., Aduriz G., Nunes T., Juste R. A. (2012): Bluetongue virus serotype 1 outbreak in the Basque Country (Northern Spain) 2007-2008. Data support a primary vector windborne transport. *PLoS ONE*, 7(3):e34421.
- Gethmann J., Probst C., Conraths F. J. (2020): Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. *Front. Vet. Sci.*, 7:65.
- Groschupp S., Kampen H., Werner D. (2023): Occurrence of putative *Culicoides* biting midge vectors (Diptera: Ceratopogonidae) inside and outside barns in Germany and factors influencing their activity. *Parasit Vectors*, 31;16(1):307.
- Guthrie A. J., Weyer C. T. (2015): African Horse sickness, Chapter 34. In Robinson's current therapy in equine medicine, 7th edition. Eds. K. A. Sprayberry, N. E. Robinson, Elsevier.
- Holwerda M., Santman-Berends I. M. G. A., Harders F., Engelsma M., Vloet R. P. M., Dijkstra E., van Gennip R. G. P., Mars M. H., Spierenburg M., Roos L., van den Brom R., van Rijn P. A. (2023): Emergence of Bluetongue Virus Serotype 3, the Netherlands, September 2023. *Emerg Infect Dis.*, 30(8):1552-1561.
- Hudson A. R., McGregor B. L., Shults P., England M., Silbernagel C., Mayo C., Carpenter M., Sherman T. J., Cohnstaedt L. W. (2023): *Culicoides*-borne Orbivirus epidemiology in a changing climate. *J Med Entomol.*, 14;60(6):1221-1229.
- Jiménez-Cabello L., Utrilla-Trigo S., Lorenzo G., Ortego J., Calvo-Pinilla E. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease Virus: Current Knowledge and Emerging Perspectives. *Microorganisms*, 11(5):1339.
- Kampen H., Werner D. (2023): Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Vectors of Viruses. *Microorganisms*, 11(11):2706.
- Lorusso A., Cappai S., Loi F., Pinna L., Ruii A., Puggioni G., Guercio A., Purpari G., Vicari D., Sghaier S., Zientara S., Spedicato M., Hammami S., Ben Hassine T.,

- Portanti O., Breard E., Sailleu C., Ancora M., Di Sabatino D., Morelli D., Calistri P., Savini G. (2023): Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis.*, 29(5):1063-1065.
- Maan S., Maan N. S., Ross-Smith N., Batten C. A., Shaw A. E., Anthony S. J., Samuel A. R., Darpel K. E., Veronesi E., Oura C. A., Singh K. P., Nomikou K., Portgieter A. C., Attoui H., van Rooij E., van Rijn P., De Clercq K., Vandenbussche F., Zientara S., Breard E., Sailleu C., Beer M., Hoffman B., Mellor P. S., Mertens P. P. (2008): Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology*, 377:308-318.
- MacLachlan N. J., Drew C. P., Darpel K. E., Worwa G. (2009): The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.*, 141:1-16.
- MacLachlan N. J., Zientara S., Savini G., Daniels P. W. (2015): Epizootic haemorrhagic disease. *Rev. Sci. Tech.*, 34:341-351.
- Mansfield K. L., Schilling M., Sanders C., Holding M., Johnson N. (2024): Arthropod-Borne Viruses of Human and Animal Importance: Overwintering in Temperate Regions of Europe during an Era of Climate Change. *Microorganisms*, 12:1307.
- Manso-Ribeiro J., Rosa-Azevedo J., Noronha F., Braco-Forte-Junior M., Vasco-Fernandez M. (1957): Fievre catarrhale du mouton (bluetongue). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 48:350-367.
- McKercher D. G., McGowan B., Howarth J. A., Saito J. K. (1953): A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 122:300-301.
- Meiswinkel R., van Rijn P., Leijts P., Goffredo M. (2007): Potential new Culicoides vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec.*, 161:564-5.
- Mellor P. S., Boorman J., Baylis M. (2000): Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.*; 45:307-40.
- Mellor P. S., Hamblin C. (2004): African horse sickness. *Vet. Res.*, 35:445-66.
- Niedbalski W. I., Fitzner A. (2020): Recent changes in the global distribution of arboviral infections in ruminants. *Med. Weter*, 76(2):71-76.
- Nolan D. V., Carpenter S., Barber J., Mellor P. S., Dallas J. F., Mordue Luntz A. J., Piertney S. B. (2007): Rapid diagnostic PCR assays for members of the Culicoides obsoletus and Culicoides pulicaris species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol.*, 124(1-2):82-94.
- Nunamaker R. A., Sieburth P. J., Dean V. C., Wigington J. G., Nunamake, C. E., Mecham J. O. (1990): Absence of transovarial transmission of bluetongue virus in culicoides variipennis immunogold labeling of bluetongue virus-antigen in developing oocytes from Culicoides variipennis (Coquillett). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 96(1):19-31.
- Ohashi S., Yoshida K., Watanabe Y., Tsuda T. (1999): Identification and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from
-

- naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3800-3803.
- Prasad G., Sreenivasulu D., Singh K. P., Mertens P. P. C., Maan S. (2009): Bluetongue in the Indian subcontinent. In Bluetongue. Eds. P. Mellor, M. Baylis, P. Mertens, Elsevier Academic Press, 167-195.
- Purse B. V., Brown H. E., Harrup L., Mertens P. P. C., Rogers D. J. (2008): Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *OIE Rev Sci Tech.*, 27(2):427-442.
- Purse B., Mellor P. S., Rogers D. J., Samuel A. R., Mertens P. P., Baylis M. (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:171-181.
- Ren N., Wang X., Liang M., Tian S., Ochieng C., Zhao L., Huang D., Xia Q., Yuan Z., Xia H. (2021): Characterization of a novel reassortment Tibet orbivirus isolated from *Culicoides* spp. in Yunnan, PR China. *J Gen Virol.*, 102(9):1-10.
- Ries C., Vögtlin A., Hüsey D., Jandt T., Gobet H., Hilbe M., Burgener C., Schweizer L., Häfliger-Speiser S., Beer M., Hoffmann B. (2021): Putative novel atypical BTV serotype '36' identified in small ruminants in Switzerland. *Viruses*, 13(5):721.
- Ruder M. G., Lysyk T. J., Stallknecht D. E., Foil L. D., Johnson D. J., Chase C. C., Dargatz D. A., Gibbs E. J. (2015): Transmission and epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in North America: current perspectives, research gaps, and future directions. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 15(6):348-363.
- Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M. A., Baldi L., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. (2005): Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletus Complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec.*, 157:133-9.
- Sghaier S., Sillean C., Marcacci M., Thabet S., Curini V., Ben Hassine T., Teodori L., Portanti O., Hammami S., Jurisic L., Spedicato M., Postic L., Gazani I., Ben Osman R., Zientara S., Bréard E., Calistri P., Richt J. A., Holmes E. C., Savini G., Di Ciallonardo F., Lorusso A. (2023): Epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8 in Tunisia, 2021. *Viruses*, 15(1).
- Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: Description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.
- Stevanović O., Šević K., Marić J., Krneta D., Kasagić D., Nedić D. N., Sladojević Ž. (2018): Epidemiology of bluetongue disease in sheep: results of systematic surveillance in the Republic of Srpska. In 23. Anniversary Annual Counselling of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (Bosnia and Heryegovina) with international participation, Proceedings, 53-54.
- Tomazatos A., Jöst H., Schulze J., Spinu M., Schmidt-Chanasit J., Cadar D., Luhken R. (2020): Blood-meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae)

- reveals a broad host range and new species records for Romania. *Parasites Vectors*, 13(79):2-12.
- Torina A., Caracappa S., Mellor P. S., Baylis M., Purse B. V. (2004): Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Med Vet Entomol.*, 18:81-9.
- Wellby M. P., Baylis M., Mellor P. S. (1996): Effect of temperature on survival and rate of virogenesis of African horse sickness virus in *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its significance in relation to the epidemiology of the disease. *Bull. Entomol. Res.*, 86:715-720.
- Wilson A. J., Mellor P. S. (2009): Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 364(1530):2669-81.
- Wilson A., Darpe K., Mellor P. S. (2008): Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLoS Biol.*, 6(8):e210.
- Winder, J. A. (1978): Cocoa flower Diptera: Their identity, pollinating activity and breeding sites. *Int. J. Pest. Manag.*, 24:5-18.
- Wittmann E. J., Mellor P. S., Baylis M. (2002). Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med. Vet. Entomol.*, 16:147-156.
- Yang H., Li Z., Wang J., Li Z., Yang Z., Liao D., Zhu J., Li H. (2020): Novel Serotype of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 26:3081-3083.
- Zientara S., Weyer C. T., Lecollinet S. (2015): African horse sickness. *Rev. Sci. Tech.*, 34:315-327.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401054M

UDK 636.2.09:618.14-006.6

Originalni naučni rad

KLINIČKI ENDOMETRITIS KRAVA: KORELACIJA TELESNE KONDICIJE, KVALITETA VAGINALNE SLUZI, LAKTACIJE, DNEVNE MLEČNOSTI I PROCENTA POLIMORFONUKLEARNIH ĆELIJA U CITOLOŠKOM RAZMAZU ENDOMETRIJUMA

Bojan MILOVANOVIĆ^{1*}, Milan MALETIĆ², Nemanja ZDRAVKOVIĆ¹,
Nemanja JEZDIMIROVIĆ¹, Slobodanka VAKANJAC², Jovan BLAGOJEVIĆ²,
Branislav KURELJUŠIĆ¹

¹Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

*Korespondentni autor: Bojan Milovanović, bojan.milovanovic@nivs.rs

Sažetak

Ova studija je imala za cilj da utvrdi korelaciju između ocene telesne kondicije, proizvodnih parametara (laktacija i dnevna proizvodnja mleka), kvaliteta vaginalne sluzi i procenta polimorfonuklearnih ćelija iz citološkog razmaza poreklom iz materice mlečnih krava sa dijagnozom kliničkog endometritisa. Ispitivanje je obuhvatilo 14 Holštajn-Frizijskih krava u prvoj i drugoj laktaciji. Procena kvaliteta vaginalne sluzi je izvršena upotrebom Metrichcek[®] instrumenta. Citološki brisevi iz materice su uzorkovani upotrebom Cytoprint AI[®] katetera. Procena kvaliteta vaginalne sluzi i uzorkovanje citološkog brisa iz materice je izvršeno 25. i 26. dana laktacije. Rezultati ove studije su pokazali da ne postoji značajna korelacija između procenta polimorfonuklearnih ćelija i mlečnosti ili laktacije. Međutim, pronađena je značajna negativna korelacija između ocene telesne kondicije i kvaliteta vaginalne sluzi, što sugerise da krave sa višim ocenama telesne kondicije imaju manji rizik za nastanak kliničkog endometritisa. Rezultati ove studije su u skladu s postojećom literaturom koja sugerise da ocene telesne kondicije može poslužiti kao pokazatelj stepena rizika za nastanak kliničkog endometritisa.

Ključne reči: dnevna mlečnost, kvalitet vaginalne sluzi, laktacija, mlečna krava, ocena telesne kondicije, polimorfonuklearne ćelije.

UVOD

Smenjivanje gestaciono-nelaktacione faze u negestaciono-laktacionu fazu predstavlja visok faktor rizika za nastanak puerperalnih oboljenja i naziva se tranzicioni period (Contreras i Sordillo, 2011). Tokom ovog perioda dešavaju se fiziološke oscilacije, primarno u hormonalnim i metaboličkim putevima (Maletić i sar., 2024). Neposredno nakon teljenja, homeoretskim mehanizmima dolazi do preraspodele energije u mlečnu

žlezdu što dovodi do negativnog energetskog bilansa (NEB). Sistemska inflamacija kao i mineralni disbalansi takođe predstavljaju procese koji su uobičajena pojava u ovom periodu. Polovina tek oteljenih krava ne uspe da se adaptira na novonastale izazove što za posledicu ima nastanak strukturnih i molekulskih promena na nivou reproduktivnih organa primarno na nivou materice i jajnika (Serbetci i sar., 2023). Ove promene se mogu manifestovati u vidu kliničkih i supkliničkih oboljenja (Maletić i sar., 2024). U ova oboljenja se ubrajaju puerperalna oboljenja materice, metabolički disbalansi kao i lokomotorna oboljenja (Vergara i sar., 2014).

Prevalenca puerperalnih oboljenja materice poput puerperalnog metritisa, kliničkog metritisa, kliničkog endometritisa (KE) i supkliničkog endometritisa je 2.8%, 25%, 29% i 26% respektivno (Vallejo-Timaran i sar., 2021). Sve u svemu, prevalenca postporođajnih oboljenja materice tokom prvih 60 dana nakon teljenja je 51.2%. Međutim, prevalenca zavisi od tipa farme odnosno načina držanja, individualnih karakteristika krava, dana uzorkovanja i primenjenim graničnim vrednostima.

Klinički endometritis predstavlja oboljenje materice koje nastaje nakon 21 dana posle teljenja (DPT) i manifestuje se klinički vidljivim znakovima bolesti, te stoga ne predstavlja problem u rutinskoj dijagnostici (Sheldon i sar., 2009). Međutim, stepen oštećenja odnosno inflamacije tokom KE može da varira. Metode kojima se može utvrditi stepen oštećenja/inflamacije prouzrokovan sa KE se može kvantifikovati upotrebom Metricecka® (Pleticha i sar., 2009) i određivanjem stepena inflamacije endometrijuma upotrebom citoloških briseva (Milovanović i sar., 2023).

Cilj ovog rada je da se utvrdi da li postoji veza/korelacija između pojedinih telesnih faktora (ocena telesne kondicije (OTK)), proizvodnih parametara (laktacija i dnevna mlečnost), kvaliteta vaginalne sluzi i procenta polimorfonuklearnih ćelija (PMN) kod krava obolelih od kliničkog endometritisa.

MATERIJALI I METODE

Ovaj eksperiment je obuhvatio ukupno $n=14$ krava Holštajn-Frizijske rase koje su bile u prvoj i drugoj laktaciji. Krave koje su obuhvaćene eksperimentom su bile prosečne telesne mase $550 \pm 32,4$ kg. Sve krave su hranjene identičnom ishranom u vidu kompletnog miksovanog obroka (TMR). Krave su vakcinisane vakcinama Bovilis BVD® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand), Bovilis IBR Marker live® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand) i Bravoxin 10® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand). Upotrebom farmskog softvera DairyComp 305 (Valley Agricultural Software, Tulare, California) dobijeni su podaci vezani za broj laktacija, dane u laktaciji i dnevnu mlečnost.

Klinički pregledi krava izvršeni su 25. i 26. dana nakon teljenja. Neposredno pre određivanja kvaliteta vaginalne sluzi i uzorkovanja brisa iz materice izvršen je vizuelni pregled krava. Za eksperiment su odabrane samo krave koje su imale patološki vaginalni iscedak.

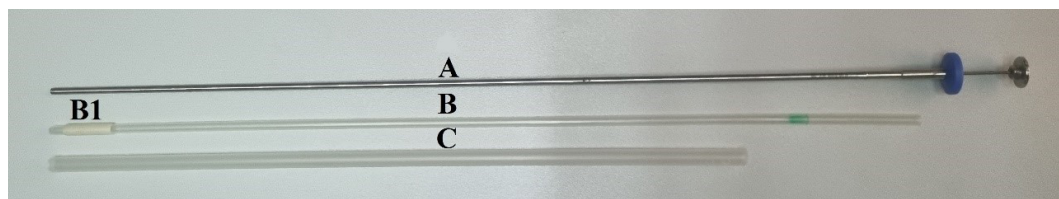
Ocena telesne kondicije (OTK) izvršena je po metodi opisanoj od strane (Bauer, 2021) koja se sastoji od gradacione skale OTK 2-5.

Provera kvaliteta vaginalne sluzi je izvršena uz pomoć Metricheck® instrumenta (Slika 1) (Simcro, New Zealand). Pre uvođenja instrumenta u vaginu, usmine su očišćene papirnim ubrusom kako bi se sprečila kontaminacija. Nakon toga, instrument je uveden u vaginu i sproveden do *fornix vaginae*. Ručka instrumenta lagano je podignuta ka dorzalnoj komisuri vagine i instrument retrahovan kaudalno kako bi se sa ventralnog zida vaginalnog kanala prikupila vaginalna sluz (Milovanović i sar., 2023). Određivanje kvaliteta vaginalne sluzi je izvršeno vizuelnom metodom opisanom od strane (Pleticha i sar., 2009), na sledeći način: ocena 0=čista prozirna sluz, ocena 1=sluz sa krpicama gnoja, ocena 2=mukopurulentni iscedak, ocena 3=gnojni/smrđljivi/truležni iscedak.



Slika 1 Metricheck® instrument za kvalitativnu analizu kvaliteta vaginalne sluzi (A-Metrichecka®; A1-kolektor vaginalne sluzi)

Uzorkovanje citološkog brisa iz materice je izvršeno upotrebom Cytoprint AI® katetera (Slika 2).



Slika 2 Inseminator i Cytoprint AI® kateter za uzorkovanje citološkog brisa endometrijuma

(A-inseminator za veštačko osemenjavanje; B-Cytoprint AI® kateter; B1-vrh Cytoprint AI® katetera za uzorkovanje citološkog brisa endometrijuma; C-protektivni tubus Cytoprint AI® katetera)

Pre uzorkovanja citološkog brisa, *ampula recti* je ispražnjena manuelno. Nakon toga, usmine su obrisane papirnim ubrusom. Cytoprint AI® kateter je stavljen na inseminator (pistolet). Bimanuelnom metodom, uz rektalno navođenje Cytoprint AI® kateter je uveden kroz *cervix* u matericu. Bris je eksponiran povlačenjem protektivnog tubusa ka rukohvatu inseminatora. Bris sa dorzalnog zida materice je uzorkovan rotiranjem

Klinički endometritis krava: korelacija telesne kondicije, kvaliteta vaginalne sluzi, laktacije, dnevne mlečnosti i procenta polimorfonuklearnih ćelija u citološkom razmazu endometriјuma

inseminatora sa Cytoprint AI® kateterom u smeru kretanja kazaljki na satu. Nakon toga, protektivni tubus Cytoprint AI® katetera je vraćen u početni položaj kranijalno kako bi se citološki bris zaštitio od kontaminacije prilikom retrahovanja napolje (Milovanović i sar., 2023). Nakon ekstrakcije instrumenta van vagine pristupljeno je pripremanju citološkog preparata. Čista mikroskopska pločica (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) je pripremljena i na nju je nanesen vrh Cytoprint AI® katetera na kome se nalaze ćelije poreklom sa endometriјuma. Silikonski vrh katetera je celom dužinom mikroskopske pločice rotiran kako bi se ćelije ravnomerno nanele na mikroskopsku pločicu. Mikroskopska pločica sa citološkim razmazom je nakon toga ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi i transportovana do laboratorije.

Priprema citološkog preparata je izvršena bojenjem citološkog razmaza upotrebom MGG Quick Stain (Bio Optica, Milano, Italy) prema uputstvu od strane proizvođača. Citološki preparati su nakon toga osušeni na vazduhu. Mikroskopska procena preparata je izvršena brojanjem minimum 200 ćelija na uvećanju 400×. Utvrđivanje procenta polimorfonuklearnih ćelija (PMN) je izvršeno upoređivanjem odnosa endometriјalnih i PMN ćelija (Slika 3).

Statistička obrada podataka je urađena u programskom sistemu Prism ver.8 (Graphpad, USA), a rezultati su prikazani kroz tabele i grafikone u programskom softveru MS Office Package (Microsoft, USA).

REZULTATI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju uočeno je da je dnevna mlečnost ispitivanih grla varirala od 13,00 L do 29,70 L mleka, u proseku 22,39 L. Kvalitet vaginalne sluzi bio je u opsegu između 1 i 3, u proseku 2,88. Ocena telesne kondicije kretala se u intervalu između 2,5 i 3,25, u proseku 2,85 dok je % PMN u citološkim brisevima materice bio u opsegu od 5,39-82,92%. Detaljni rezultati ovih parametara za svaku kravu pojedinačno su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1 Rezultati proizvodnje mleka, procenta polimorfonuklearnih ćelija, ocene telesne kondicije i kvaliteta vaginalne sluzi prikazani u pojedinačnim vrednostima za svaku ispitivanu jedinku

Krava	Laktacija / grupa	Dnevna proizvodnja mleka u litrima	% PMN u citološkom brisu	OTK	Kvalitet vaginalne sluzi
1.	1	29,7	29,16	2,75	2
2.	2	27,1	61,88	3,25	1
3.	1	27,6	82,92	2,75	3
4.	2	22	50,08	2,75	1
5.	2	19	5,39	3	1

6.	2	26	41,83	2,75	1
7.	2	19	35,23	2,75	2
8.	1	13	69,9	2,75	3
9.	2	21	66,81	3	2
10.	2	23	42,51	3	1
11.	1	25	50,61	2,5	3
12.	1	22	80	3	1
13.	1	16	65,06	3	1
14.	1	23	35,89	3	1

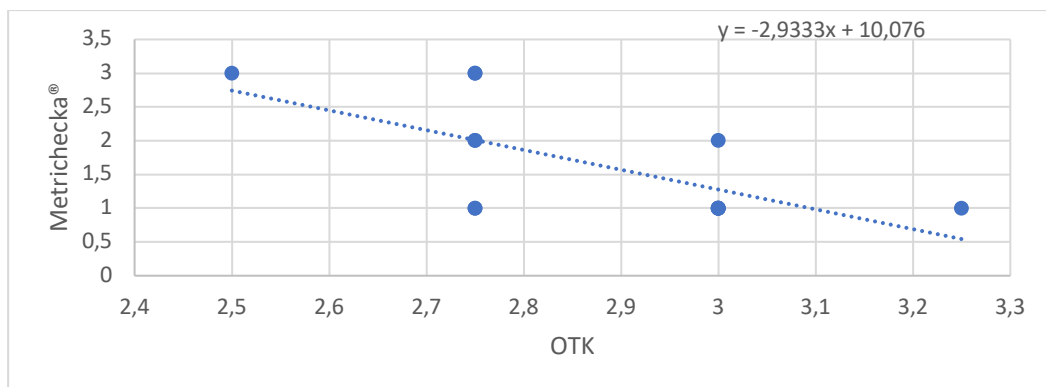
Rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2 Utvrđene korelacije između ispitivanih parametara

Parametri	Laktacija / grupa	Dnevna proizvodnja mleka u litrima	% PMN	OTK	Metrich eck®
Laktacija	1,00	-0,09	-0,37	0,25	-0,40
Dnevna proizvodnja mleka u litrima	-0,09	1,00	-0,08	-0,15	0,06
% PMN	-0,37	-0,08	1,00	0,06	0,31
OTK	0,25	-0,15	0,06	1,00	-0,66*
Metrich ecka®	-0,40	0,06	0,31	-0,66*	1,00

* statistička značajnost utvrđena na nivou $p < 0.05$

Statistički značajna korelacija je uočena u odnosu OTK i Metrich eck® parametara, pri čemu je uočeno da krave sa visokim Metrich eck® skorom imaju nižu OTK vrednost. Odnos Metrich eck® i OTK rezultata je prikazana na Slici 3.



Slika 3 Korelativna analiza rezultata parametara Metrichack® i OTK

DISKUSIJA

Nakon teljenja, krave se adaptiraju na promene koje su nastale smenjivanjem gravidno-nelaktacione faze u negravidno-laktacionu fazu. U ovom periodu nastaje sistemska inflamacija koja za cilj ima pripremu reproduktivnih organa za novu oplodnju i graviditet. Klinički endometritis nastaje ukoliko se inflamacija materice prolongira nakon 21 dana posle teljenja uz prisustvo patološkog vaginalnog iscetka i povećanog %PMN (Pascottini i sar., 2022). Dijagnoza KE se sprovodi upotrebom Metrichack® uređaja ili manuelno (Pascottini i sar., 2020).

Na osnovu dobijenih rezultata posmatrane grupe krava uočava se da bi u teoriji svako povećanje OTK za vrednost boda 1 dovelo do smanjenja Metrichack® vrednosti za 2,933 puta, odnosno, da krave koje imaju lošiju ocenu telesne kondicije imaju veći faktor rizika za nastanak KE. U praksi to ne znači da krave treba da budu preuhranjene već u adekvatnoj telesnoj kondiciji shodno proizvodno-reproduktivnoj fazi laktacije. Rezultati dobijeni u ovoj studiji korespondiraju sa rezultatima dobijenim u studijama koje su za cilj imale utvrđivanje veze između ova dva posmatrana parametra (Bogado Pascottini i LeBlanc, 2020; Kadivar i sar., 2014; Wathes i sar., 2009).

Ocena telesne kondicije predstavlja metodu kojom se indirektno može proceniti energetska status krava (Rearte i sar., 2023). Utvrđeno je da kod krava sa visokim energetska deficitom inflamacija materice prolongirana i perzistira nakon 2 nedelje nakon teljenja za razliku od krava sa umerenim energetska deficitom (Wathes i sar., 2009). Energetska deficit ukazuje na maladaptaciju na postpartalni period sa posledničnim nastankom metaboličkih oboljenja koja se odlikuju nedostatkom glukoze (Sordillo i Raphael, 2013). Ispitivanjem biohemijskih parametara iz seruma krava utvrđeno je da su nivoi neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), β -hidroksibuterne kiseline (BHB) značajno viši kod krava sa KE za razliku od zdravih krava (Bogado Pascottini i LeBlanc, 2020). Visoki nivoi NEFA i BHB ukazuju na metaboličku maladaptaciju na postpartalni period. Posledično tome dolazi do disfunkcije

polimorfonuklearnih ćelija još dok se nalaze u krvnom koritu, odnosno čak i pre nego što uđu u matericu. Takođe, analizom kompletne krvne slike utvrđeno je da krave koje se nalaze u visokom enerгетском deficitu imaju manje leukocita od krava koje su bile u umerenom enerгетском deficitu (Wathes i sar., 2009). Sa druge strane studija (Bartolome i sar., 2014) koja je za cilj imala upoređivanje protokola za terapiју KE je zaključila da krave koje imaju višu OTK znatno bolje reaguју na terapiју za razliku od krava sa niskom OTK (Bartolome i sar., 2014). Stoga, korelacija između OTK i Metrichеck® skora (kvaliteta vaginalne sluzi) dobijena u našoj studiji ukazuje da ovi parametri mogu biti koristan alat za procenu rizika za nastanak KE.

Korelacija % PMN i laktacije u našoj studiji nije utvrđena. Pojedine studije сугеришу da postoji razlika između %PMN shodno broју laktacija, odnosno da prvotelke imaju znatno вишi % PMN od višetelki (Mehrзad i sar., 2002), odnosno веći broj cirkulišućih eozinofila i nezrelih leukocita (Mehrзad i sar., 2002). Od % PMN zavisi одговор materice na inflamaciju. Međutim, ukoliko se krava nalazi u stanju enerгетског deficita % PMN ne mora biti reprezentativan pokazatelj zdravlja materice, jer je funkcionalna sposobnost PMN u tom slučaju narušena nedostatkom glukoze. Takođe, da bi se ustanovila veza između %PMN, proizvodnih parametara možda je potrebno u analizu uključiti krave sa više od dve laktacije kao i веće grupe životinja nego što je to slučaj u našoj studiji.

Korelacija % PMN i dnevne mlečnosti u našoj studiji nije utvrđena. U studiji koja je za cilj imala utvrđivanje veze između proizvodnih parametara i supkliničког endometritisa odnosno % PMN i dnevne mlečnosti je ustanovila pozitivnu korelaciju između ova dva parametra (Barrio i sar., 2015). Studija Barrio i sar. (2015) je sprovedena u Španiji na веćem broју krava. Takođe, Španija ima topliju klimu, a pojedine studije su dokazale da % PMN zavisi i od klimatskih prilika (Olde Riekerink i sar., 2007).

ZAKLJUČAK

Ustanovljena je negativna korelacija između OTK i Metrichеck® skora (kvaliteta vaginalne sluzi). Tačnije, svako povećanje OTK za vrednost boda 1 dovela je do smanjenja Metrichеck® vrednosti za 2,933 puta. Odnosno, krave s višom ocenom OTK imaju manji rizik za nastanak kliničког endometritisa. Međutim, to ne znači da krave treba da budu preuhranjene, već da budu u adekvatnoj kondiciji shodno proizvodno-reproduktivnoj fazi laktacije. Korelacija između ostalih posmatranih parametara % PMN i proizvodnih parametara (laktacija i dnevna mlečnost) nije utvrđena.

Zahvalnica

Rad je podrжан sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-66/2024-03/200030 i 451-03-66/2024-03/200143).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Barrio M., Vigo M., Quintela L. A., Becerra J. J., García-Herradón P. J., Bello D. M., Fernandez-Sanchez F. I., Prieto A., Cainzos J., Pena A. I. (2015): Influence of subclinical endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(4):1-6.
- Bartolome J. A., Khalloub P., de la Sota R. L., Drillich M., Melendez P. G. (2014): Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):79-85.
- Bauer J.-C. (2021): The Effect of Mindfulness on Entrepreneurs of Early-Stage Start-Up Teams. *Nomos Verlagsgesellschaft*, 109-118.
- Bogado Pascottini O., LeBlanc S. J. (2020): Metabolic markers for purulent vaginal discharge and subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 155:43-48.
- Contreras G. A., Sordillo L. M. (2011): Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3):281-289.
- Kadivar A., Ahmadi M. R., Vatankhah M. (2014): Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):121-126.
- Maletić M., Prodanović R., Kureljušić B., Džakula S., Milovanović B. (2024): Uloga metaboličkih stresora u nastanku supkliničkog endometritisa kod krava. 35. Savetovanje Veterinara Srbije, Zbornik radova, 159-172.
- Mehrزد J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C. (2002): Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 85(12):3268-3276.
- Milovanović B., Kureljušić B., Milićević V., Zdravković N., Kureljušić J., Marinković D., Maletić M. (2023): Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma tauri* in Holstein Friesian dairy cows with subclinical endometritis. *Acta Veterinaria*, 73(3):421-431.
- Olde Riekerink R. G. M., Barkema H. W., Stryhn H. (2007): The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(4):1704-1715.
- Pascottini O. B., Leroy J. L. M. R., Opsomer G. (2022): Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S4):21-32.
- Pascottini O. B., Van Schyndel J., Spricigo J. F. W., Rousseau J., Weese J. S., LeBlanc S. J. (2020): Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific Reports*, 10(1):1-11.
-

- Pleticha S., Drillich M., Heuwieser W. (2009): Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(11):5429-5435.
- Rearte R., Lorenti S. N., Dominguez G., de la Sota R. L., Lacau-Mengido I. M., Giuliodori M. J. (2023): Monitoring of Body Condition in Dairy Cows to Assess Disease Risk at the Individual and Herd Level. *Animals*, 13(19):1-11.
- Serbetci I., González-Grajales L. A., Herrera C., Ibanescu I., Tekin M., Melean M., Magata F., Malama E., Bollwein H., Scarlet D. (2023): Impact of negative energy balance and postpartum diseases during the transition period on oocyte quality and embryonic development in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10:1328700.
- Sheldon I. M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H. J. (2009): Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6):1025-1032.
- Sordillo L. M., Raphael W. (2013): Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2):267-278.
- Vallejo-Timaran D. A., Reyes J., Gilbert R. O., Lefebvre R. C., Palacio-Baena L. G., Maldonado-Estrada J. G. (2021): Incidence, clinical patterns, and risk factors of postpartum uterine diseases in dairy cows from high-altitude tropical herds. *Journal of Dairy Science*, 104(8):9016-9026.
- Vergara C. F., Döpfer D., Cook N. B., Nordlund K. V., McArt J. A. A., Nydam D. V., Oetzel G. R. (2014): Risk factors for postpartum problems in dairy cows: Explanatory and predictive modeling. *Journal of Dairy Science*, 97(7):4127-4140.
- Wathes, D. C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M. A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J. J. (2009): Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39(1):1-13.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401063M

UDK 636.2.09:618.14-006.6

Original Scientific Paper

CLINICAL ENDOMETRITIS IN COWS: CORRELATION OF BODY CONDITION, QUALITY OF VAGINAL MUCUS, LACTATION, DAILY MILK PRODUCTION AND THE PERCENTAGE OF POLYMORPHONUCLEAR CELLS IN THE CYTOLOGICAL SMEAR OF THE ENDOMETRIUM

Bojan MILOVANOVIĆ^{1*}, Milan MALETIĆ², Nemanja ZDRAVKOVIĆ¹,
Nemanja JEZDIMIROVIĆ¹, Slobodanka VAKANJAC², Jovan BLAGOJEVIĆ²,
Branislav KURELJUŠIĆ¹

¹Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

²University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Bojan Milovanović, bojan.milovanovic@nivs.rs

Summary

This study aimed to determine the correlation between body condition score, production parameters (lactation and daily milk production), vaginal mucus quality and the percentage of polymorphonuclear cells from cytological smears originating from the uterus of dairy cows diagnosed with clinical endometritis. The study included 14 Holstein-Friesian cows in the first and second lactation. Assessment of the quality of vaginal mucus was performed using the Metrichheck[®] instrument. Cytological smears from the uterus were sampled using the Cytoprint AI[®] catheter. Evaluation of the quality of vaginal mucus and sampling of the cytological smear from the uterus was performed on the 25th and 26th days of lactation. The results of this study indicated that there was no significant correlation between the percentage of polymorphonuclear cells and milk yield or lactation. However, a significant negative correlation was found between body condition score and vaginal mucus quality, suggesting that cows with higher body condition scores have a lower risk of developing clinical endometritis. The results of this study are in line with the existing literature suggesting that body condition scores can serve as an indicator of the degree of risk for the development of clinical endometritis.

Key words: daily milk yield, vaginal mucus quality, lactation, dairy cow, body condition score, polymorphonuclear cells.

INTRODUCTION

Changing the gestation-non-lactation phase into the non-gestation-lactation phase represents a high risk factor for the onset of puerperal diseases and is called the transition period (Contreras and Sordillo, 2011). During this period, physiological oscillations occur, primarily in hormonal and metabolic pathways (Maletić et al., 2024). Immediately after calving, homeoretic mechanisms redistribute energy to the

mammary gland, which leads to a negative energy balance (NEB). Systemic inflammation as well as mineral imbalances are also processes that are common during this period. Half of newly calved cows fail to adapt to new challenges, which results in structural and molecular changes at the level of the reproductive organs, primarily at the level of the uterus and ovaries (Serbetci et al., 2023). These changes can be manifested in the form of clinical and subclinical diseases (Maletić et al., 2024). These diseases include puerperal diseases of the uterus, metabolic imbalances and locomotor diseases (Vergara et al., 2014).

The prevalence of puerperal uterine diseases such as puerperal metritis, clinical metritis, clinical endometritis (CE) and subclinical endometritis is 2.8%, 25%, 29% and 26%, respectively (Vallejo-Timaran et al., 2021). Overall, the prevalence of postpartum uterine diseases during the first 60 days after calving is 51.2%. However, the prevalence depends on the type of farm, i.e. the way of keeping, the individual characteristics of the cows, the day of sampling and the applied reference values.

Clinical endometritis is a disease of the uterus that occurs after 21 days after calving (DAC) and is manifested by clinically visible signs of the disease, and therefore does not represent a problem in routine diagnostics (Sheldon et al., 2009). However, the degree of damage or inflammation during CE can vary. Methods to determine the degree of damage/inflammation caused by CE can be quantified using Metricheck® (Pleticha et al., 2009) and by determining the degree of endometrial inflammation using cytological smears (Milovanović et al., 2023).

The aim of this study is to determine whether there is a connection/correlation between individual body factors (body condition score (BCS)), production parameters (lactation and daily milk yield), quality of vaginal mucus and the percentage of polymorphonuclear cells (PMN) in cows suffering from clinical endometritis.

MATERIALS AND METHODS

This experiment included a total of $n=14$ cows of the Holstein-Friesian breed that were in the first and second lactation. The average body weight of the cows included in the experiment was 550 ± 32.4 kg. All cows were fed an identical diet in the form of a total mixed ration (TMR). Cows were vaccinated with Bovilis BVD® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand), Bovilis IBR Marker live® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand) and Bravoxin 10® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand). Using the DairyComp 305 farm software (Valley Agricultural Software, Tulare, California), data related to the number of lactations, days in lactation and daily milk yield were obtained.

Clinical examinations of the cows were performed on the 25th and 26th days after calving. Immediately before determining the quality of vaginal mucus and sampling the swab from the uterus, a visual inspection of the cows was performed. Only cows with pathological vaginal discharge were selected for the experiment.

The assessment of body condition (BCS) was performed according to the method described by (Bauer, 2021), which consists of a gradation scale of BCS 2-5.

Checking the quality of vaginal mucus was performed using the Metricheck® instrument (Figure 1) (Simcro, New Zealand). Before introducing the instrument into the vagina, the lips were cleaned with a paper towel to prevent contamination. After that, the instrument was introduced into the vagina and led to the fornix vaginae. The handle of the instrument was slightly raised towards the dorsal commissure of the vagina and the instrument retracted caudally in order to collect vaginal mucus from the ventral wall of the vaginal canal (Milovanović et al., 2023). Determination of the quality of vaginal mucus was performed using the visual method described by (Pleticha et al., 2009), as follows: grade 0=clear transparent mucus, grade 1=mucus with patches of pus, grade 2=mucopurulent discharge, grade 3=purulent/ smelly/putrid discharge.



Figure 1 Metrichecka® instrument for qualitative analysis of the quality of vaginal mucus (A-Metrichecka®; A1- vaginal mucus collector)

Sampling of the cytological swab from the uterus was performed using the Cytoprint AI® catheter (Figure 2).

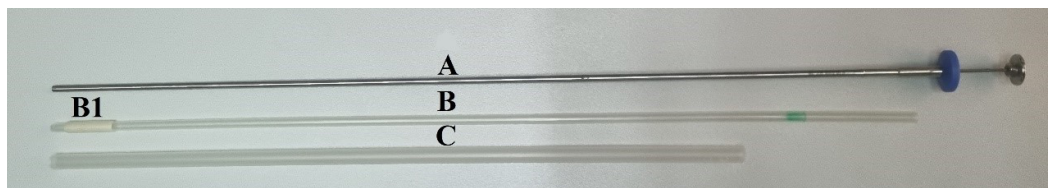


Figure 2 Inseminator and Cytoprint AI® catheter for endometrial cytology swab sampling (A- inseminator for artificial insemination; B-Cytoprint AI® catheter; B1- tip of the Cytoprint AI® catheter for endometrial cytology smear sampling; C- Cytoprint AI® catheter protective tube)

Before sampling the cytological smear, the *ampulla recti* was emptied manually. After that, the lips were wiped with a paper towel. The Cytoprint AI® catheter is placed on the inseminator (gun). Using the bimanual method, with rectal guidance, the Cytoprint AI® catheter was introduced through the cervix into the uterus. The swab is exposed by pulling the protective tube towards the handle of the inseminator. A swab from the dorsal wall of the uterus was sampled by rotating the inseminator with the Cytoprint

AI® catheter in a clockwise direction. After that, the protective tube of the Cytoprint AI® catheter was returned to its initial position cranially in order to protect the cytological swab from contamination when retracing it outside (Milovanović et al., 2023). After the extraction of the instrument outside the vagina, the preparation of the cytological preparation was started. A clean microscope slide (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) was prepared and the tip of the Cytoprint AI® catheter containing cells of endometrial origin was placed on it. The silicone tip of the catheter is rotated along the entire length of the microscope slide in order to spread the cells evenly on the microscope slide. The microscope slide with the cytological smear was then left to dry at room temperature and transported to the laboratory.

The preparation of the cytological preparation was carried out by staining the cytological smear using MGG Quick Stain (Bio Optica, Milano, Italy) according to the manufacturer's instructions. The cytological preparations were then air-dried. Microscopic evaluation of the preparation was performed by counting a minimum of 200 cells at 400× magnification. Determination of the percentage of polymorphonuclear cells (PMN) was performed by comparing the ratio of endometrial and PMN cells (Figure 3).

Statistical data processing was done in the Prism ver.8 software system (Graphpad, USA), and the results were presented through tables and graphs in the MS Office Package software (Microsoft, USA).

RESULTS

Based on the results obtained in this study, it was observed that the daily milk yield of the examined cows varied from 13.00 L to 29.70 L of milk, on average 22.39 L. The quality of vaginal mucus was in the range between 1 and 3, on average 2.88. The body condition score ranged between 2.5 and 3.25, with an average of 2.85, while the % of PMN in uterine cytological smears was in the range of 5.39-82.92%. Detailed results of these parameters for each cow are shown in Table 1.

Table 1 Results of milk production, percentage of polymorphonuclear cells, body condition score and quality of vaginal mucus shown in individual values for each tested individual

Cow	Lactation / group	Daily milk production in liters	% PMN in a cytological smear	BCS	Quality of vaginal mucus
1.	1	29.7	29.16	2.75	2
2.	2	27.1	61.88	3.25	1
3.	1	27.6	82.92	2.75	3
4.	2	22	50.08	2.75	1
5.	2	19	5.39	3	1

Clinical endometritis in cows: correlation of body condition, quality of vaginal mucus, lactation, daily milk production and the percentage of polymorphonuclear cells in the cytological smear of the endometrium

6.	2	26	41.83	2.75	1
7.	2	19	35.23	2.75	2
8.	1	13	69.9	2.75	3
9.	2	21	66.81	3	2
10.	2	23	42.51	3	1
11.	1	25	50.61	2.5	3
12.	1	22	80	3	1
13.	1	16	65.06	3	1
14.	1	23	35.89	3	1

The results of the statistical analysis are shown in Table 2.

Table 2 Correlations established between the examined parameters

Parameters	Lactation / group	Daily milk production in liters	% PMN	BCS	Metrich eck®
Lactation	1.00	-0.09	-0.37	0.25	-0.40
Daily milk production in liters	-0.09	1.00	-0.08	-0.15	0.06
% PMN	-0.37	-0.08	1.00	0.06	0.31
BCS	0.25	-0.15	0.06	1.00	-0.66*
Metrich ecka®	-0.40	0.06	0.31	-0.66*	1.00

* statistical significance determined at the $p<0.05$ level

A statistically significant correlation was observed in the relationship between BCS and Metrich eck® parameters, where it was observed that cows with a high Metrich eck® score had a lower BCS value. The relationship between Metrich eck® and BCS results is shown in Figure 3.

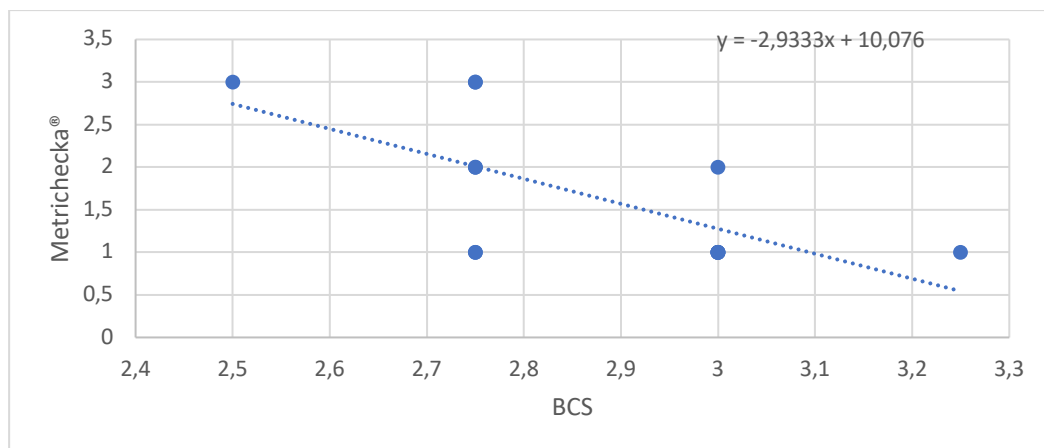


Figure 3 Correlative analysis of Metriheck® and BCS parameter results

DISCUSSION

After calving, cows adapt to the changes caused by transition from the pregnant-non-lactating phase to the non-pregnant-lactating phase. In this period, systemic inflammation occurs, which aims to prepare the reproductive organs for new fertilization and pregnancy. Clinical endometritis occurs if uterine inflammation is prolonged for more than 21 days after calving with the presence of pathological vaginal discharge and increased %PMN (Pascottini et al., 2022). The diagnosis of CE is carried out using the Metriheck® device or manually (Pascottini et al., 2020).

Based on the obtained results, it can be observed that in theory any increase in BCS by the point 1 would lead to a decrease in the Metriheck® value by 2.933 times, that is, that cows with a lower body condition score have a higher risk factor for the occurrence of CE. In practice, this does not mean that cows should be overfed, but in adequate physical condition according to the productive and reproductive phase of lactation. The results obtained in this study correspond with the results obtained in studies that aimed to determine the relationship between these two observed parameters (Bogado Pascottini and LeBlanc, 2020; Kadivar et al., 2014; Wathes et al., 2009).

Body condition score is a method that can indirectly assess the energy status of cows (Rearte et al., 2023). It was found that in cows with a high energy deficit, uterine inflammation was prolonged and persisted for 2 weeks after calving, unlike cows with a moderate energy deficit (Wathes et al., 2009). Energy deficit indicates maladaptation to the postpartum period with the consequent emergence of metabolic diseases characterized by glucose deficiency (Sordillo and Raphael, 2013). Examination of biochemical parameters from the serum of cows revealed that the levels of non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyric acid (BHB) are significantly higher in cows with CE, in contrast to healthy cows (Bogado Pascottini and LeBlanc, 2020). High levels of NEFA and BHB indicate metabolic maladaptation to the postpartum

period. As a result, polymorphonuclear cells become dysfunctional even while they are in the bloodstream, that is, even before they enter the uterus. Also, by analyzing the complete blood count, it was determined that cows with a high energy deficit have fewer leukocytes than cows with a moderate energy deficit (Wathes et al., 2009). On the other hand, a study (Bartolome et al., 2014) aimed at comparing protocols for CE therapy concluded that cows with a higher BCS respond significantly better to therapy in contrast to cows with low BCS (Bartolome et al., 2014). Therefore, the correlation between BCS and Metrichheck® score (vaginal mucus quality) obtained in our study indicates that these parameters can be a useful tool for assessing the risk of CE.

The correlation between PMN % and lactation was not established in our study. Some studies suggest that there is a difference between %PMN according to the number of lactations, i.e. that primiparous heifers have a significantly higher % PMN than multiparous heifers (Mehrzhad et al., 2002), i.e. a higher number of circulating eosinophils and immature leukocytes (Mehrzhad et al., 2002). The response of the uterus to inflammation depends on the % of PMN. However, if the cow is in a state of energy deficit, % PMN may not be a representative indicator of uterine health, because the functional ability of PMN in that case is impaired by the lack of glucose. Also, in order to establish the relationship between %PMN, production parameters, it may be necessary to include in the analysis cows with more than two lactations, as well as larger groups of animals than is the case in our study.

The correlation between % PMN and daily milk yield was not established in our study. In a study that aimed to determine the relationship between production parameters and subclinical endometritis, namely % PMN and daily milk yield, a positive correlation was found between these two parameters (Barrio et al., 2015). The study by Barrio et al. (2015) was conducted in Spain on a larger number of cows. Also, Spain has a warmer climate, and some studies have shown that % PMN also depends on climatic conditions (Olde Riekerink et al., 2007).

CONCLUSION

A negative correlation was found between BCS and Metrichheck® score (vaginal mucus quality). More precisely, each increase in BCS by 1 point led to a decrease in Metrichheck® value by 2.933 times. That is, cows with a higher BCS score have a lower risk of developing clinical endometritis. However, this does not mean that cows should be overfed, but that they should be in adequate condition according to the productive and reproductive phase of lactation. Correlation between other observed parameters % PMN and production parameters (lactation and daily milk yield) was not established.

Acknowledgment: The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (contracts No. 451-03-66/2024-03/200030 and 451-03-66/2024-03/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Barrio M., Vigo M., Quintela L. A., Becerra J. J., García-Herradón P. J., Bello D. M., Fernandez-Sanchez F. I., Prieto A., Cainzos J., Pena A. I. (2015): Influence of subclinical endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(4)1-6.
- Bartolome J. A., Khalloub P., de la Sota R. L., Drillich M., Melendez P. G. (2014): Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):79-85.
- Bauer J.-C. (2021): The Effect of Mindfulness on Entrepreneurs of Early-Stage Start-Up Teams. *Nomos Verlagsgesellschaft*, 109-118.
- Bogado Pascottini O., LeBlanc S. J. (2020): Metabolic markers for purulent vaginal discharge and subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 155:43-48.
- Contreras G. A., Sordillo L. M. (2011): Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3):281-289.
- Kadivar A., Ahmadi M. R., Vatankhah M. (2014): Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):121-126.
- Maletić M., Prodanović R., Kureljušić B., Džakula S., Milovanović B. (2024): Uloga metaboličkih stresora u nastanku supkliničkog endometritisa kod krava. 35. Savetovanje Veterinara Srbije, Zbornik radova, 159-172.
- Mehrzaad J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C. (2002): Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 85(12):3268-3276.
- Milovanović B., Kureljušić B., Milićević V., Zdravković N., Kureljušić J., Marinković D., Maletić M. (2023): Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma tauri* in Holstein Friesian dairy cows with subclinical endometritis. *Acta Veterinaria*, 73(3):421-431.
- Olde Riekerink R. G. M., Barkema H. W., Stryhn H. (2007): The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(4):1704-1715.
- Pascottini O. B., Leroy J. L. M. R., Opsomer G. (2022): Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S4):21-32.
- Pascottini O. B., Van Schyndel J., Spricigo J. F. W., Rousseau J., Weese J. S., LeBlanc S. J. (2020): Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific Reports*, 10(1):1-11.

- Pleticha S., Drillich M., Heuwieser W. (2009): Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(11):5429-5435.
- Rearte R., Lorenti S. N., Dominguez G., de la Sota R. L., Lacau-Mengido I. M., Giuliadori M. J. (2023): Monitoring of Body Condition in Dairy Cows to Assess Disease Risk at the Individual and Herd Level. *Animals*, 13(19):1-11.
- Serbetci I., González-Grajales L. A., Herrera C., Ibanescu I., Tekin M., Melean M., Magata F., Malama E., Bollwein H., Scarlet D. (2023): Impact of negative energy balance and postpartum diseases during the transition period on oocyte quality and embryonic development in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10:1328700.
- Sheldon I. M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H. J. (2009): Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6):1025-1032.
- Sordillo L. M., Raphael W. (2013): Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2):267-278.
- Vallejo-Timaran D. A., Reyes J., Gilbert R. O., Lefebvre R. C., Palacio-Baena L. G., Maldonado-Estrada J. G. (2021): Incidence, clinical patterns, and risk factors of postpartum uterine diseases in dairy cows from high-altitude tropical herds. *Journal of Dairy Science*, 104(8):9016-9026.
- Vergara C. F., Döpfer D., Cook N. B., Nordlund K. V., McArt J. A. A., Nydam D. V., Oetzel G. R. (2014): Risk factors for postpartum problems in dairy cows: Explanatory and predictive modeling. *Journal of Dairy Science*, 97(7):4127-4140.
- Wathes, D. C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M. A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J. J. (2009): Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39(1):1-13.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401072G

UDK 636.52/.58.082.47:579.68

Оригинални научни рад

МИКРОБИОЛОШКИ СТАТУС ВОДЕ ЗА ПИЋЕ СА БРОЈЛЕРСКИХ ФАРМИ И СПОСОБНОСТ СТВАРАЊА БИОФИЛМА ИЗОЛОВАНИХ ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА

Бојан ГОЛИЋ^{1*}, Александра ШМИТРАН², Љиљана БОЖИЋ², Драган
КНЕЖЕВИЋ¹, Дејана КРНЕТА¹, Горан ВАСИЛИЋ¹, Дејан ЛАУШЕВИЋ³,
Жељко ЦВЕТНИЋ⁴, Драго Н. НЕДИЋ⁵

¹Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања
Лука, Босна и Херцеговина

²Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, Бања Лука, Босна и
Херцеговина

³Специјалистичка ветеринарска лабораторија, Подгорица, Црна Гора

⁴Хрватска академија знаности и умјетности, Загреб, Хрватска

⁵Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Бојан Голић, bojan.golic@virs-vb.com

Сажетак

Вода је есенцијална хранлива материја у развоју бројлерских пилића, који је конзумирају у великим количинама. Обезбјеђење безбједне и квалитетне воде кључно је у очувању здравља јединке. Биофилм представља заштитни механизам бактерија да се групишу и преживе неповољне услове у спољашњој средини. Најчешће се формира на преласку између водене средине и ваздуха или водене средине и чврстог супстрата у природи. Истраживање је вршено током 2023. године и обухвата 150 узорака воде поријеклом са фарми бројлерских пилића. Лабораторијско испитивање воде вршено је методама BAS EN ISO 6222, BAS EN ISO 9308 и BAS EN ISO 7899-2. Циљ истраживања је утврђивање микробиолошког статуса воде поријеклом са фарми живине, као и испитивање способности продукције биофилма изолованих патогених бактерија из воде, који бактерије врло лако и ефикасно стварају у воденом екосистему, а који значајно може допринијети стварању антимикробне резистенције. Микробиолошким испитивањем утврђено је 64,67% задовољавајућих и 35,33% незадовољавајућих узорака воде за пиће. Вода за пиће на фармама бројлерских пилића има веома неповољан микробиолошки статус, посебно са становишта неповољног утицаја патогених бактерија на ову осјетљиву категорију живине. Поступак дезинфекције воде потребно је преиспитати и значајно побољшати, посебно имајући у виду значајну употребу бунарске и изворске воде, те повољне услове за стварање биофилма у системима за напајање. Сојеви *Escherichia coli* показали значајно

боље стварање биофилма на температури 25°C у односу на 37°C, као и у односу на изолате *Enterococcus spp.*

Кључне ријечи: вода, микробиологија, бројлери, патогени, биофилм.

УВОД

Птице су мале животиње које рано сазријевају, а њихова мања отпорност може довести до тога да буду подложније инфекцијама, углавном узрокованим патогенима цријевног поријекла, који могу бити присутни у води, па Масаги (1997) и Englert (1998) препоручују да се вода за пиће намијењена људима користи за напајање птица.

Вода је најкритичнија хранлива материја за живину (Bell, 2002) која помаже у метаболизму и излучивању (Jafari и сар., 2006). У поређењу с другим хранливим материјама, птице конзумирају воду у великим количинама. Потрошња воде би могла бити двоструко већа од количине хране која је унесена и може варирати у зависности од старости и врсте птица, нивоа активности, температуре ваздуха, влажности, брзине дисања и постојећих болести, те и услова околине као што је топлотни стрес.

Свако повећање или смањење нормалне потрошње воде живине може указивати на здравствени поремећај код птица (Butcher и сар., 1999). Доступност и квалитет воде имају значајну улогу у укупном здрављу и продуктивности птица. Међутим, улога обезбјеђивања безбједне и квалитетне воде за оптималне перформансе углавном се занемарује.

Бактерија су присутне у води за пиће, чак и у релативно великом броју (10^3 до 10^6 CFU/ml), без посљедица по људско здравље, све док нема присутних патогена (Hoefel и сар., 2005; Hammes и сар., 2008; Vital и сар., 2012).

Многе заразне болести животиња и људи преносе се водом контаминираним излучевинама људи и животиња, која постаје извор патогених бактерија, вируса и паразита и повећава здравствени ризик (Sasakova и сар., 2013; Fridrich и сар., 2014).

Употреба индикаторских организама, посебно колиформне групе, у циљу процјене потенцијалног присуства патогена који се преносе водом, кључна је за заштиту јавног здравља (Hijnen и сар., 2020).

Escherichia coli је колиформна бактерија, сматра се примарним индикатором фекалне контаминације третиране и нетретиране воде и јавља у фецесу свих сисара, често у великом броју (Edberg, 2000; WHO, 2008).

Ентерококе укључују бројне врсте које се јављају у фецесу људи и топлокрвних животиња и сматрају се секундарним индикаторима фекалног загађења (WHO, 2008).

Развој цријевне микрофлоре код животиња дубоко је под утицајем њиховог раног животног окружења (Ballou и сар., 2016). Смањење оптерећења бактеријама у

околном окружењу, а самим тим и смањење уноса патогена, има предност за успостављање здраве екологије пријевне микрофлоре.

Meza (1989) наводи да би требало да постоји боља бактериолошка контрола воде која се даје птицама током почетне фазе развоја, пошто постоји брзи бактеријски раст и повећан је здравствени ризик за птице од 1 до 21 дана старости.

Мора се истаћи да је вода којом се птице снабдијевају на многим фармама, контаминирана у изворима. Пријављено је да су узорци из извора воде и резервоара били контаминирани *Escherichia coli* у 10 фарми бројлера и кока носиља, што је доказ фекалног загађења узорака (Amaral и сар., 1999; Amaral и сар., 2001).

Болести узроковане бактеријама, вирусима и протозоама спадају међу најчешће болести у живинарству, у којима вода за пиће игра важну улогу (Gama, 1995).

Присуство бактерија, гљивица, минерала и адитива за воду у систему воде за живину и појилицама омета ефикасне праксе управљања, које имају за циљ постизање оптималног учинка (Oviedo, 2006).

Микробна контаминација у води за пиће живине угрожава опште здравље и перформансе птица (Maharjan и сар., 2016). Системи за напајање у живинарницима могу бити одговарајуће станиште за бактерије, које представљају здравствени ризик за птице.

Биофилм представља сесилан начин живота микроорганизама и настаје тако што бактерије, након пријањања за подлогу и успјешног размножавања, почињу да синтетишу љепљиви полисахаридни матриксни омотач, који има улогу у додатном учвршћивању биофилма за подлогу, као и у механичкој заштити бактерија унутар биофилма од услова спољашње средине, дејства антимикробних супстанци и имунског система домаћина, уколико се биофилм ствара у живом домаћину (Liu и сар., 2016). Уколико се биофилм ствара у неживој средини, долази до појаве биокорозије и оштећења подлоге на којој се биофилм створио. Биофилм представља начин на који бактерије превазилазе неповољне услове спољашње средине и опстају и шире се с неживе средине на домаћина (људе или животиње).

Формирање заједнице унутар биофилма је један од значајнијих механизма који доприносе настанку антимикробне резистенције, јер спречава пролазак антибиотика до бактерија и омогућава бактеријама да пређу у перзисторске облике са смањеним метаболизмом и диобом (Bowler и сар., 2020). Због тога су за ерадикацију овако формулисаних бактерија потребне дозе антибиотика које су 10-1.000 пута веће од оних који се испитују класичним путем за појединачне планктонске сојеве. Биофилм представља заштитни механизам бактерија да се групишу, формирајући заштитни омотач од егзоплоисахарида, те преживе неповољне услове у спољашњој средини. Биофилм, односно сесилна заједница микроорганизама, најчешће се формира на преласку између водене средине и ваздуха или водене средине и чврстог супстрата у природи. Унутар биофилма су

бактерије заштићене, али због ограничених хранљивих материја, бактерије почињу да угибају, што слаби сесилну заједницу и заштитни омотач, те доводи до слабљења и општећења биофилма. На тај начин се бактерије, које имају способност формирања биофилма, расипају и траже нове супstrate и нише у којима се налазе повољнији услови за поновно груписање и ширење биофилма у природи. Биофилм је веома битан због дуготрајног опстанка и преживљавања бактерија у вјештачким супстратима и срединама попут водоводне мреже, филтера, инструмената који се користе током прања и руковања са намирницама, који могу послужити као значајан резервоар бактерија за сталну контаминацију воде и намирница, односно могу изазвати инфекције и интоксикације. Због повезаности биофилма с могућом контаминацијом водоводних система и индиректном контаминацијом хране током прања таквом водом, веома је битно испитати способност бактерија да формирају биофилм на температури спољашње средине и на температури топлокрвних организама.

Виша температура воде и стагнирајући проток у систему за напајање живине повећавају размножавање бактерија и стварање биофилма (Maharjan и сар., 2017). Студије су забиљежиле повећано формирање биофилма на већим температурама воде (Kadam и сар., 2013; Bonsaglia и сар., 2014).

Poimenidou и сар. (2016) уочили су да је температура од 20°C више подстакла формирање биофилма него на 37°C, што је температура објекта у другој половини периода раста птица.

Нетретирана вода за пиће у фармама може да испољи већу осјетљивост на присуство патогена у систему за напајање. Чак су и третиране воде за пиће биле подложне стварању биофилма у систему за напајање живине, током периода раста јата. Стога, чишћење система за напајање између два турнуса постаје обавезна пракса за побољшање (Raut и сар., 2024).

Слаба ефикасност дезинфекционих средстава против полимерне матрице биофилма фаворизује бољу заштиту бактерија на његовим површинама, упркос пракси дезинфекције (Muhterem-Uyar и сар., 2015). Испирање система за напајање дезинфикованом водом ослобађа супстанце и тако уклања развијени биофилм.

Циљ истраживања је утврђивање микробиолошког статуса воде поријеклом са фарми живине, као и испитивање способности продукције биофилма изолованих патогених бактерија из воде, који бактерије врло лако и ефикасно стварају у воденом екосистему, а који значајно може допринијети стварању антимикробне резистенције.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Материјал за испитивање је 150 узорка воде поријеклом са фарми товних пилића лоцираних на територији Републике Српске, који су узорковани у 2023. години, од чега су 93 узорка (62%) поријеклом из водовода, 44 узорка (29,33%) бунарске

воде и 13 узорака (8,67%) изворске воде. Већина узорака бунарске и изворске воде третирана је дезинфекционим средствима непосредно прије испуштања у систем за напајање.

Узорковање је вршено на начин да су уклоњени сви наставци са славине, вода је пуштена да тече 2-3 минута, након чега је затворена славина и извршена дезинфекција славине алкохолом и стерилизација пламеном, па је поново пуштена вода да тече 2-3 минута. Након тога је вода сипана у затамњене стерилне стаклене флаше запремине 1 литар, при чему је у исте сипана вода у количини од $\frac{3}{4}$ запремине флаше. Узорци су транспортовани на температури $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, а испитивање је обављено у року од 6 часова од узорковања.

Лабораторијско испитивање воде вршено је следећим стандардним методама:

- број микроорганизама на 22°C и 37°C према BAS EN ISO 6222 (ИСБИХ, 2003а),
- број цријевних ентерокока према BAS EN ISO 7899-2 (ИСБИХ, 2003б),
- број колиформних бактерија и *Escherichia coli* према BAS EN ISO 9308 (ИСБИХ, 2018).

Правилником о здравственој исправности воде намијењене за људску употребу (Пропис, 2017) утврђени су параметри испитивања и микробиолошких критеријуми (Табела 1).

Табела 1 Параметри испитивања и микробиолошки критеријуми

Параметар	Пречишћена вода	Непречишћена вода
	Критеријум	
Број микроорганизама на 22°C	100CFU/1 ml	300CFU/1 ml
Број микроорганизама на 37°C	20CFU/1 ml	100CFU/1 ml
Цријевне ентерококе	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
Колиформи	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml

Испитивање продукције биофилма је рађено по методи Stepanovic и сар. (2000), с модификацијом у концентрацији испитиваног инокулума од 10^6 CFU/ml, који је припремљен у модно срчаном инфузионом бујону (ВНІ). За сваки сој рађене су по 3 пробе, тј. за сваки сој су инокулисане по три рупице са 100 μl ВНІ. Микротитарске плоче су затим инкубисане 24 сата на 25°C и 37°C . Након инкубације садржај плоче је одстрањен пипетирањем, а свака рупица три пута испрана пуфером. Адхерисане бактерије фиксиране су сушењем на ваздуху. Послије сушења је у сваку рупицу пипетирано по 100 μl боје кристал виолет из сета за бојење по Граму (Biomerieux, France). Бојење је трајало 15 минута, након чега су плоче три пута испране пуфером и осушене на ваздуху. Да би се ресуспендовала боја, у сваку рупицу је додато по 100 μl 30% сирћетне киселине

(Зорка, Шабан). Екстинкција је очитана на аутоматизованом ICN Flow Titrek Multiscan Plus читачу на λ од 570 nm. На свакој плочи за микротитрацију кориштене су по 3 негативне пробе, тј. у 3 рупице је инокулисан стерилан ТХУ бујон. На основу тога одређена је гранична (cutt-off) вриједност екстинкције ODc, која се израчунавала као средња вриједност три негативне пробе увећана за три стандардне девијације. Изолати су означени као непродуктори биофилма, те слаби, умјерени и јаки продуктори на основу следећих формула:

- $OD < ODc$ (непродуктори)
- $ODc < OD < 2 \times ODc$ (слаби продуктори)
- $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$ (умјерени продуктори)
- $4 \times ODc < OD$ (јаки продуктори).

Као позитивна контрола кориштен је референтни сој *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

У анализи добијених резултата микробиолошких испитивања користили смо дескриптивне статистичке параметре (Excel, Micosoft Office 2019). За поређење степена продукције биофилма између две групе бактерија, кориштен је Фишеров тест тачне вјероватноће. За поређење биомасе створеног биофилма код две групе тестираних бактерија кориштен је Т тест. Вриједност $p < 0,05$ сматрана је статистички значајном.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Микробиолошко испитивања узорака воде

Микробиолошки квалитет воде се дефинише као максимално прихватљив број или концентрација бактерија које не представљају опасност по здравље (Пропис, 2020), а *Escherichia coli* и цријевни ентерококе сматрају се основним параметрима.

Производња и дистрибуција биолошки стабилне воде може се постићи само адекватним праћењем и контролом микробиолошких процеса током третмана и дистрибуције воде (Prest и сар., 2016).

Оцјена микробиолошке усаглашености узорака воде за пиће извршена је у односу на Правилник о здравственој исправности воде намијењене за људску употребу (Пропис, 2017).

Микробиолошким испитивањем утврђено је 64,67% задовољавајућих и 35,33% незадовољавајућих узорака воде за пиће, а резултати по категоријама воде приказани су у Табели 2.

Табела 2 Резултати микробиолошког испитивања по категоријама

Категорија воде	Задовољавајући узорци %	Незадовољавајући узорци %
Водовод	74,19	25,81
Бунар	54,55	45,45
Извор	30,77	69,23

Вода је неопходна за организме да одржавају своје основне метаболичке активности, а квалитет воде за пиће је несумњиво повезан са здрављем и перформансама животиња (El-Katcha и сар., 2018; Guo и сар., 2022).

Kalaba и сар. (2018) су утврдили да је 26,20% узорака воде добијених са фарми животиња било незадовољавајуће у Републици Српској за период од 2015. до 2017. године, а Golić и сар. (2023) су утврдили да је 45,82% узорака воде било незадовољавајуће током 2022. године. Добијени резултати се налазе у опсегу претходних истраживања, и указују на варијације из године у годину, што указује на константну значајну микробиолошку контаминацију воде за пиће, те, како на неадекватност поступка дезинфекције, тако и на недоследност у његовој примјени.

У Табели 3 приказани су незадовољавајући узорци према параметрима испитивања.

Табела 3 Незадовољавајући узорци према параметрима испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %
Број микроорганизама на 22°C	12,67
Број микроорганизама на 37°C	15,33
Цријевне ентерококе	13,33
<i>Escherichia coli</i>	20
Колиформи	20

Резултати указују на то да осим *Escherichia coli* није било других колиформа у испитиваним узорцима воде. У студији микробиолошке анализе воде на фармама у Републици Српској (Kalaba и сар., 2015), утврђено је да је 62,66% узорака воде добијених са фарми животиња било незадовољавајуће и да су најчешћи узроци неправилности били везани за ентерококе, *Escherichia coli* и укупан број колонија на 22°C и 37°C. Сличне резултате добили су Golić и сар. (2023). Резултати добијени у нашем истраживању потврђују претходне, само са значајно мањим процентуалним учешћем по испитиваном параметру.

У Табели 4 приказани су незадовољавајући резултати микробиолошког испитивања у односу на укупан број узорака по категоријама, према параметру испитивања.

Табела 4 Незадовољавајући резултати микробиолошког испитивања у односу на укупан број узорака по категоријама према параметру испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %		
	Водовод	Бунар	Извор
Број микроорганизама на 22°C	8,60	13,64	38,46
Број микроорганизама на 37°C	11,83	18,18	30,77
Цријевне ентерококе	9,68	13,64	38,46
<i>Escherichia coli</i>	13,98	18,18	69,23
Колиформи	13,98	18,18	69,23

У периоду 2018-2020. година, утврђено је да је 23,41% узорака воде поријеклом са фарми животиња било неисправно (Golić и сар., 2021), од чега је 10,19% узорака због присуства цријевних ентерокока, а 6,44% узорака због присуства *Escherichia coli*. У нашем истраживању добијени су слични резултати за цријевне ентерококе, али и значајно повољнији резултати по питању *Escherichia coli*. Највећи проценат незадовољавајућих узорака односи се на изворску воду, могуће из разлога што се она не дезинфикује, за разлику од водоводске и бунарске воде. У Табели 5 приказани су резултати микробиолошког испитивања по категоријама и параметру испитивања у односу на незадовољавајуће узорке.

Табела 5 Резултати микробиолошког испитивања по категоријама и параметру испитивања у односу на незадовољавајуће узорке

Параметар	Незадовољавајући узорци у %		
	Водовод	Бунар	Извор
Број микроорганизама на 22°C	33,33	30	55,56
Број микроорганизама на 37°C	45,83	40	44,44
Цријевне ентерококе	37,50	30	55,56
<i>Escherichia coli</i>	54,17	40	100
Колиформи	54,17	40	100

Фекални колиформи су пријављени у узорцима воде из 20 фарми (50%), који су били изнад максимално прихватљивог нивоа (Jafari и сар., 2006). Amaral и сар. (1995) су утврдили да 90% узорака воде из бунара и 100% узорака воде из извора има бактерије које указују на фекално загађење. Kalaba и сар. (2018) су установили да је 63,40% незадовољавајућих узорака последица повећаног

укупног броја колонија на 22°C, 54,90% је посљедица повећаног укупног броја колонија на 37°C, 58,80% посљедица присуства цревних ентерокока, 31,40% посљедица присуства колиформа и 19% посљедица присуства *Escherichia coli*. Такође, и у нашем истраживању добијен је висок проценат незадовољавајућих узорака воде за пиће у односу на параметре испитивања.

Испитивање стварања биофилма код *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* изолата

Укупно је испитано 30 сојева *Escherichia coli* и 20 сојева *Enterococcus spp.*, који су изоловани из свих узорака током основне микробиолошке анализе. Испитивање је вршено на начин да је одређивана укупна количина биомасе биофилма на основу екстинкције боје. Сојеви су на основу негативних контрола означени као непродуктори биофилма, те као слаби, умјерени и снажни продуктори.

Код сојева *Escherichia coli* уочено је постојање статистички високо значајне разлике у биомаси створеног биофилма, као и у степену продукције биофилма на тестираним температурама инкубације (Табела 6). На собној температури је више од половине изолата (17/30, тј. 56,7%) показало јаку продукцију биофилма, док су на температури топлокрвних организама најучесталији били умјерени продуктори (16/30, тј. 53%). Када је у питању биомаса створеног биофилма, уочено је да су изолати на собној температури створили биомасу у вриједности од $0,63 \pm 0,71$, у односу на статистички високо значајно мању продукцију биофилма на температури топлокрвних организама $0,21 \pm 0,12$ ($p=0,003$).

Табела 6 Продукција биофилма *Escherichia coli* изолата на две испитиване температуре у %

Сој	25°C	37°C	<i>p</i>
Непродуктор	3 (10%)	2 (6,7%)	0,001*
Слаб продуктор	7 (23,3%)	7 (23,3%)	
Умјерен продуктор	3 (10%)	16 (53,3%)	
Јак продуктор	17 (56,7%)	5 (16,7%)	

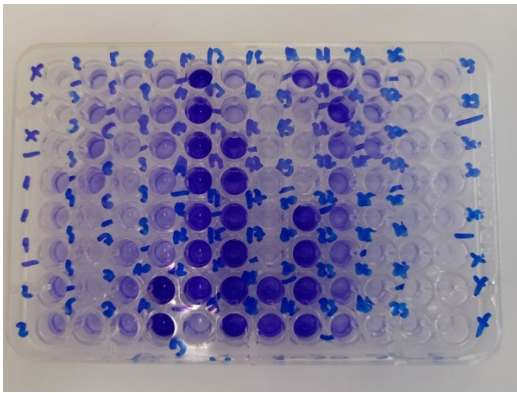
Са друге стране, ентерококе су показале подједнаку способност продукције биофилма, било да је испитиван степен продукције биофилма (Табела 7) или биомаса. На обе температуре су стварали готово подједнаку биомасу биофилма (0,07 на нижој, односно 0,09 на вишој температури) ($p>0,05$).

Голић и сар.:
Микробиолошки статус воде за пиће са бројлерских фарми и способност стварања биофилма
изолованих патогених бактерија

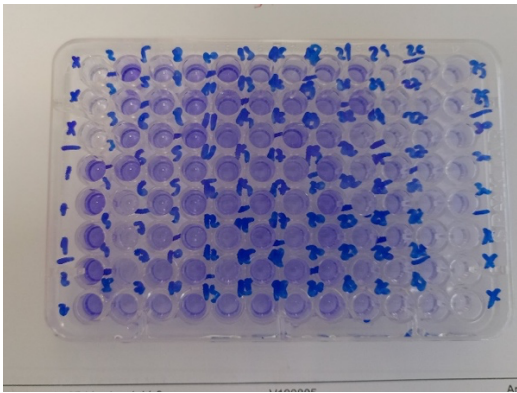
Табела 7 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* изолата на две испитиване температуре

Сој	25°C	37°C	<i>p</i>
Непродуктор	8 (40%)	2 (10%)	0,06
Слаб продуктор	8 (40%)	8 (40%)	
Умјерен продуктор	3 (15%)	9 (45%)	
Јак продуктор	1 (5%)	1 (5%)	

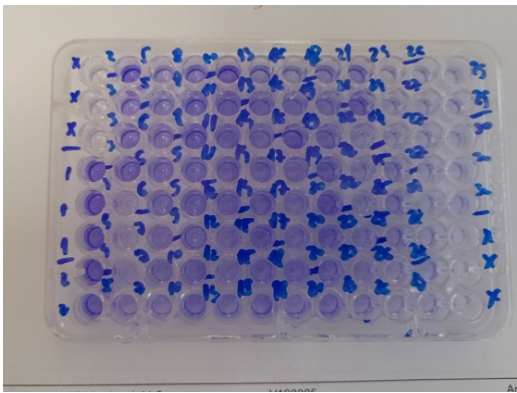
Када се упореди способност формирања биофилма између ове две бактерије на наведеним температурама, уочава се да је *Escherichia coli* била значајно бољи продуктор биофилма кад су у питању и биомаса и степен продукције биофилма на 25°C ($p=0,001$, $p=0,00018$) (Слика 1-4).



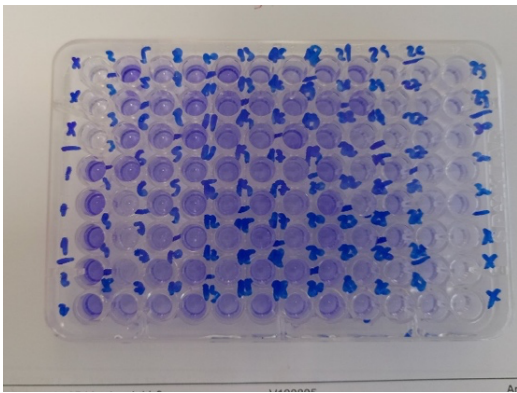
Слика 1 Продукција биофилма *Escherichia coli* на 25°C



Слика 2 Продукција биофилма *Escherichia coli* на 37°C



Слика 3 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* на 25°C



Слика 4 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* на 37°C

На собној температури већина изолата *Escherichia coli* били су умјерени и јаки продуктори (20/30, тј. 66,7%), док су код ентерокока већина изолата били непродуктори и слаби продуктори (16/20, тј. 80%). Ово је јасно видљиво уколико се посматра и биомаса биофилма, јер је екстинкција боје била десетоструко већа на 25°C. На температури топлокрвних организама оба испитивана микроорганизма подједнако добро су продуковали биофилм када се пореди степен продукције биофилма, као и створена биомаса ($p > 0,05$, $p > 0,05$).

Стварање биофилма је универзални протективни начин заштите микроорганизма у неповољним условима. Водени екосистем у природи или у дистрибутивној водоводној мрежи представљају одличну средину за настанак микробних заједница у виду биофилма, који бактерије саме стварају након што достигну критичан број на одређеном супстрату или подлози (Liu и сар., 2016). У нашем испитивању су сојеви *Escherichia coli* показали значајно боље стварање биофилма на нижој температури у односу на вишу температуру инкубације, као и у односу на изолате ентерокока. Наши резултати су у сагласности са радом Ingle и сар. (2011) и Maltholouti и сар. (2018) који су, такође, доказали бољу продукцију биофилма на 25°C, поготово уколико су кориштене богате хранљиве подлоге неутралног рН, као што је било у нашем случају. Важни фактори вируленције који доприносе стварању биофилма су коврцави пили и продукција целулозе. Пили су важни и као фактор адхеренције и као градивни протеински елемент, а целулоза као доминантна полисахаридна компонента. Ген за продукцију целулозе се инактивише на температури од 37°C, док се активира на температури нижој од 30°C (Uhlich и сар., 2014). Ово би могло бити објашњење и наших резултата. С друге стране, температура није имала утицаја на стварање биофилма ентерококних сојева, чак и кад су кориштене температуре у распону од 10-45°C (Marinho и сар., 2013), што се слаже с нашим истраживањем. Исти аутори показали су да је додатак веће концентрације глукозе довео до разлике у стварању биофилма на различитим температурама. У будућим радовима било би интересантно утврдити да ли ће и сојеви кориштени у нашем испитивању имати слично понашање. Такође, Jahan и сар. (2014), показали су да је боља продукција биофилма на 25°C у односу на 37°C зависна првенствено од врсте и да су *Enterococcus faecalis* изолати били бољи продуктори у односу на *Enterococcus faecium*, што пред нас ставља битан задатак да урадимо специјацију наших изолата, да бисмо утврдили које врсте су биле доминантне у нашој студији.

ЗАКЉУЧАК

Вода за пиће на фармама бројлерских пилића има веома неповољан микробиолошки статус, посебно са становишта неповољног утицаја патогених бактерија на ову осјетљиву категорију живине. Поступак дезинфекције воде потребно је преиспитати и значајно побољшати, посебно имајући у виду значајну употребу бунарске и изворске воде, те повољне услове за стварање биофилма у

системима за напајање. Сојеви *Escherichia coli* показали значајно боље стварање биофилма на температури 25°C у односу на 37°C, као и у односу на изолате *Enterococcus spp.* С обзиром да нисмо испитивали утицај хранљивих материја на дејство продукције биофилма и да нисмо имали потпуну идентификацију изолата, не можемо дати коначан одговор због чега су изолати ентерокока значајно мање стварали биофилм, осим да претпоставимо да су оне, као грам позитивне бактерије, мање волуминозне и нису биле индуковане на продукцију биофилма у степену у ком су то радили грам негативни изолати *Escherichia coli*. Слична истраживања нису рађена и нема доступних података, тако да нам у будућим истраживањима остаје да детектујемо факторе вируленције код обе врсте који су битни током стварања биофилма, да бисмо разјаснили њихово понашање у сесилној заједници у воденим екосистемима.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање Републике Српске (Уговор број 19.032/961-101/23).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Amaral L. A., Nader Filho A., Isa H., Barros L. S. S. (2001): Qualidade higiênico-sanitária e demanda de cloro da água de dessedentação de galinhas de postura coletadas em bebedouros tipo nipple e taça. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 3(3):249-255.
- Amaral L. A., Nader Filho A., Rossi Junior O. D., Penha L. H. C. (1995): Características microbiológicas da água utilizada no processo obtenção do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 15(2/3):85-88.
- Amaral L. A., Rossi Junior O. D., Cardoso V. (1999): Qualidade higienico-sanitária da água de bebedouros pendular e nipple utilizados na criação de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 1(2):145-148.
- Ballou A. L., Ali R. A., Mendoza M. A., Ellis J. C., Hassan H. M., Croom W. J., Koci M. D. (2016): Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. *Front. Vet. Sci.*, 3:(2).
- Bauer, A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 36:493-496.
- Bell D. D. (2002): Consumption and quality of water. In *Commercial Chicken Meat and Egg Production*, 5th edition. Eds. D. D. Bell., W. D. Weaver, Jr. Springer, 411-430.
- Bonsaglia E. C. R., Silva N. C. C., Fernandes A. J., Araujo J. P. J., Tsunemi M. H., Rall V. L. M. (2014): Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35:386-391.
-

- Bowler P., Murphy C., Wolcott R. (2020): Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-5.
- Butcher G. D., Jacob J. P., Mather F. B. (1999): Common poultry diseases, Fact Sheet PS-47. University of Florida, 1-19.
- Edberg S. C., Rice E. W., Karlin R. J., Allen M. J. (2000): *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88:106-116.
- El-Katcha M., Soltan M. A., El-Shobokshy S. A., Kasser M. (2018): Impact of water acidification or magnetic treatment on growth performance, health and oxidative status of broiler chicks challenged by *Salmonella enteritidis*. *Alex. J. Vet. Sci.*, 59:154-168.
- Englert S. (1998): Produção de frangos de corte. In: Avicultura: tudo sobre raças, manejo e alimentação. 7^ª. Eds. S. Englert, Guaíba: Agropecuária, 94-151.
- Fridrich B., Krcmar D., Dalmacija B., Molnar J., Pesic V., Kragulj M., Varga N. (2014): Impact of wastewater from pig farm lagoons on the quality of local groundwater. *Agricultural Water and Management*, 135:40-53.
- Gama M. S. Q. (1995): Agua, que cura, que nutre, que mata. *Aves & Ovos*, 30-33.
- Golić B., Kalaba V., Nedić D. (2021): Review of microbiological analysis of drinking water for animals in the Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina) during the period 2018-2020. *Veterinary Journal of Republic of Srpska, Banja Luka*, 21(1-2):37-49.
- Golić B., Knežević D., Pećana B. (2023): Assessment of the microbiological status of drinking water on animal farms. In XIV International Scientific Agricultural Symposium „Agrosym 2023“, Proceedings, 1086-1093.
- Guo Y. J., Wang Z. Y., Wang Y. S., Chen B., Huang Y. Q., Li P., Tan Q., Zhang H. Y., Chen W. (2022): Impact of drinking water supplemented 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid in combination with acidifier on performance, intestinal development, and microflora in broilers. *Poult. Sci.*, 101(3).
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Koster O., Egli T. (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, 42:269-277.
- Hijnen W. A. M., van Veenendaal D. A., van der Speld W. H. M., Visser A., Hoogenboezem W., van der Kooij D. (2000): Enumeration of faecal indicator bacteria in large volumes using in site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research*, 34:1659-1665.
- Hoefel D., Monis P. T., Grooby W. L., Andrews S., Saint C. P. (2005): Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J. Appl. Microbiol.*, 99:175-186.
-

- Ingle, D. J., Clermont, O., Skurnik, D., Denamur, E., Walk, S. T., & Gordon, D. M. (2011). Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp. *Applied and environmental microbiology*, 77(8):2695-2700.
- ИСБИХ (2003a): Квалитет воде – Бројање узгојених микроорганизама – Одређивање броја колонија цијепљењем агар хранљиве подлоге за гајење. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 6222.
- ИСБИХ (2003b): Квалитет воде – Детекција и бројање пријевних ентерокока – Дио 2: Метода мембранске филтрације. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 7899-2.
- ИСБИХ (2018): Квалитет воде – Бројање *Escherichia coli* и колиформних бактерија – Дио 1: Метода мембранске филтрације за воде са ниским природним фоном бактеријске флоре. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 9308-1.
- Jafari R. A., Fazlara A. M. (2006): Govahi An investigation into *Salmonella* and fecal coliform contamination of drinking water in broiler farms in Iran. *Int. J. Poult. Sci.*, 5:491-493.
- Jahan M., Holley R. A. (2014): Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *International Journal of Food Microbiology*, 170:65-69.
- Kadam S. R., den Besten H. M. W., van der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R., Abee T. (2013): Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 165:259-264.
- Kalaba V., Golić B., Ilić T. (2018): Microbiological safety of water in primary production. In 29. Counselling of veterinary of Serbia, Book of Article and Abstracts, 326.
- Kalaba V., Golić B., Kasagić D., Nedić D., Dojčinović S. (2015): Determining the microbiological safety of water on farms in the Republic of Srpska. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 15(2):259-271.
- Liu S., Gunawan C., Barraud N., Rice S. A., Harry E. J., Amal R. (2016): Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*, 50(17), 8954-8976.
- Macari M. (1997): Qualidade da água e bebedouros para frangos de corte: tipos, vantagens e desvantagens. In: Conferência Apinco'97 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas: Facta, 121-143.
- Maharjan P., Clark T., Kuenzel C., Foy M. K., Watkins S. (2016): On-farm monitoring of the impact of water system sanitation on microbial levels in broiler house water supplies. *J. Appl. Poult. Res.*, 25:266-271.
- Maharjan P., Dey S., Huff G., Zhang W., Phillips G. K., Watkins S. (2017): Effect of chlorine treatment on inhibition of *E coli* serogroup O2 incorporation into 7-day-old biofilm on polyvinylchloride surface. *Poult. Sci.*, 96:2862-2870.
-

- Mathlouthi A., Pennacchietti E., De B. D. (2018): Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 10(4(39)):129-132.
- Marinho A. R., Martins P. D., Ditmer E. M., d'Azevedo P. A., Frazzon J., Van der Sand S. T., Frazzon A. P. G. (2013): Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:423-426.
- Meza H. (1989): Controle de qualidade na produção de frangos de corte. *Avicultura & Suinocultura Industrial*, 80:38-44.
- Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A. S., Hernandez M., Kapetanakou A. E., Kuchta T., Manios S. G., Melero B., Minarovicova J., Nicolau A. I., Rovira J., Skandamis P. N., Jordan K., Lazaro D. R., Stessl B., Wagner M. (2015): Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51:94-107.
- Oviedo E. O. (2006): Important factors in water quality to improve broiler performance. *N. Carolina Poultry Industry Joint Area Newsletter*, 1:7-8.
- Poimenidou S. V., Chrysadaku M., Tzakoniati A., Bikouli V. C., Nychas G. J., Skandamis P. N. (2016): Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 237:164-171.
- Prest E. I., Hammes F., van Loosdrecht M. C. M., Vrouwenvelder J. S. (2016): Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges. *Front. Microbiol.*, 7:45.
- Пропис (2017): Правилник о здравственој исправности воде за пиће намијењене за људску потрошњу. Службени гласник Републике Српске, 88/17.
- Пропис (2020): Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (recast). Official Journal of European Union, L435.
- Raut R., Kilonzo Nthenge A., Anume T., Basnet A., Watkins S., Maharjan P. (2024): Impacts of on-farm water sanitation practices on microbial hygiene in poultry waterlines and efficacy of sodium hypochlorite-based product on foodborne pathogens. *Journal of Applied Poultry Research*, 33(3).
- Sasakova N., Veselitz-Lakticova K., Hromada R., Chvojka D., Koscco J., Ondrasovic M. (2013): Contamination of individual sources of drinking water located in environmentally polluted Central Spis Region (Slovakia). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3:262-265.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. A. (2000): Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-9.

- Uhlich G. A., Chen C.-Y., Cottrell B. J., Nguyen L.-H. (2014): Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 354(2):133-141.
- Vital M., Dignum M., Magic-Knezev A., Ross P., Rietveld L., Hammes F. (2012): Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.*, 46:4665-4676.
- WHO (2008): Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd ed., Vol. 1. World Health Organisation.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401088G

UDK 636.52/.58.082.47:579.68

Original Scientific Paper

MICROBIOLOGICAL STATUS OF DRINKING WATER FROM BROILER FARMS AND BIOFILM-FORMING ABILITY OF ISOLATED PATHOGENIC BACTERIA

Bojan GOLIĆ^{1*}, Aleksandra ŠMITRAN², Ljiljana BOŽIĆ², Dragan KNEŽEVIĆ¹, Dejana KRNETA¹, Goran VASILIĆ¹, Dejan LAUŠEVIĆ³, Željko CVETNIĆ⁴, Drago N. NEDIĆ⁵

¹PI Veterinary Institute of the Republic of Srpska “Dr. Vaso Butozan” Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

²University of Banja Luka, Faculty of Medicine, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

³Specialist Veterinary Laboratory, Podgorica, Montenegro

⁴Croatian Academy of Sciences and Arts, Zagreb, Croatia

⁵University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Bojan Golić, bojan.golic@virs-vb.com

Summary

Water is an essential nutrient for the development of broiler chickens, which consume it in large quantities. Providing safe and high-quality water is crucial for maintaining the health of the individual. Biofilm is a protective mechanism for bacteria to group together and survive adverse conditions in the external environment. It is most often formed at the transition between the aquatic environment and air or the aquatic environment and a solid substrate in nature. The study was conducted during 2023 and included 150 water samples originating from broiler chicken farms. Laboratory testing of water was performed using the BAS EN ISO 6222, BAS EN ISO 9308 and BAS EN ISO 7899-2 methods. The aim of the study is to determine the microbiological status of water originating from poultry farms, as well as to examine the ability of isolated pathogenic bacteria from water to produce biofilms, which bacteria very easily and efficiently create in the aquatic ecosystem, and which can significantly contribute to the creation of antimicrobial resistance. Microbiological testing determined 64.67% satisfactory and 35.33% unsatisfactory drinking water samples. Drinking water on broiler chicken farms has a very unfavorable microbiological status, especially from the point of view of the adverse impact of pathogenic bacteria on this sensitive category of poultry. The water disinfection process needs to be considered and significantly improved, especially considering the significant use of well and spring water, and favorable conditions for the formation of biofilms in water supply systems. *Escherichia coli* strains showed significantly better biofilm formation at 25°C compared to 37°C, as well as compared to *Enterococcus spp* isolates.

Key words: water, microbiology, broilers, pathogens, biofilm.

INTRODUCTION

Birds are small animals that mature early, and their lower resistance make them more susceptible to infections, mainly caused by pathogens of intestinal origin, which may be present in water, so Macari (1997) and Englert (1998) recommend that drinking water intended for humans should be used for birds.

Water is the most critical nutrient for poultry (Bell, 2002) which support metabolism and excretion (Jafari et al., 2006). Compared to other nutrients, birds consume large amounts of water. Water consumption can be twice the amount of feed consumed and can vary depending on the age and species of the bird, activity level, air temperature, humidity, respiratory rate, and existing diseases, as well as environmental conditions such as heat stress.

Any increase or decrease in the normal water consumption of poultry may indicate a health disorder in the bird (Butcher et al., 1999). The availability and quality of water play a significant role in the overall health and productivity of birds. However, the role of providing safe and quality water for optimal performance is largely overlooked.

Bacteria are present in drinking water, even in relatively high numbers (10^3 to 10^6 CFU/ml), without consequences for human health, as long as no pathogens are present (Hoefel et al., 2005; Hammes et al., 2008; Vital et al., 2012).

Many infectious diseases of animals and humans are transmitted by water contaminated with human and animal excreta, which becomes a source of pathogenic bacteria, viruses and parasites and increases health risks (Sasakova et al., 2013; Fridrich et al., 2014).

The use of indicator organisms, especially the coliform group, to assess the potential presence of waterborne pathogens is crucial for the protection of public health (Hijnen et al., 2020).

Escherichia coli is a coliform bacterium, considered a primary indicator of faecal contamination of treated and untreated water and occurs in the faeces of all mammals, often in high numbers (Edberg, 2000; WHO, 2008).

Enterococci include numerous species that occur in the faeces of humans and warm-blooded animals and are considered secondary indicators of faecal pollution (WHO, 2008).

The development of the gut microbiota in animals is profoundly influenced by their early life environment (Ballou et al., 2016). Reducing the bacterial load in the surrounding environment, and thereby reducing the intake of pathogens, has the advantage of establishing a healthy gut microbiota ecology.

Meza (1989) states that there should be better bacteriological control of water given to birds during the initial phase of development, as there is rapid bacterial growth and an increased health risk for birds from 1 to 21 days of age.

It must be noted that the water supplied to birds on many farms is contaminated at the source. It has been reported that samples from water sources and tanks were contaminated with *Escherichia coli* in 10 broiler and laying hen farms, which is

evidence of faecal contamination of the samples (Amaral et al., 1999; Amaral et al., 2001).

Diseases caused by bacteria, viruses and protozoa are among the most common diseases in poultry farming, in which drinking water plays an important role (Gama, 1995).

The presence of bacteria, fungi, minerals and water additives in poultry water systems and drinkers hinders effective management practices aimed at achieving optimal performance (Oviedo, 2006).

Microbial contamination in poultry drinking water threatens the general health and performance of birds (Maharjan et al., 2016). Poultry water supply systems can be a suitable habitat for bacteria, which pose a health risk to birds.

Biofilm is a sessile lifestyle of microorganisms and is formed when bacteria, after adhering to a substrate and successfully multiplying, begin to synthesize an adhesive polysaccharide matrix shell, which plays a role in additional fixation of the biofilm to the substrate, as well as in mechanical protection of bacteria within the biofilm from external environmental conditions, the effects of antimicrobial substances and the host immune system, if the biofilm is formed in a living host (Liu et al., 2016). If the biofilm is formed in a non-living environment, biocorrosion and damage to the substrate on which the biofilm was formed occurs. Biofilm is a way in which bacteria overcome unfavorable environmental conditions and survive and spread from an inanimate environment to a host (humans or animals).

The formation of a community within a biofilm is one of the most important mechanisms contributing to the development of antimicrobial resistance, as it prevents the passage of antibiotics to bacteria and allows bacteria to transit to persistent forms with reduced metabolism and division (Bowler et al., 2020). Therefore, the eradication of bacteria formulated in this way requires doses of antibiotics that are 10-1,000 times higher than those tested classically for individual planktonic strains. Biofilm is a protective mechanism for bacteria to group together, forming a protective shell of exopolysaccharides, and survive unfavorable conditions in the external environment. Biofilm, or a sessile community of microorganisms, is most often formed at the transition between the aquatic environment and air or the aquatic environment and a solid substrate in nature. Within the biofilm, bacteria are protected, but due to limited nutrients, bacteria begin to die, which weakens the sessile community and the protective coating, leading to the weakening and damage of the biofilm. In this way, bacteria that have the ability to form biofilms disperse and seek new substrates and niches in which there are more favorable conditions for regrouping and spreading biofilms in nature. Biofilms are very important due to the long-term survival and survival of bacteria in artificial substrates and environments such as water supply networks, filters, instruments used during washing and handling food, which can serve as a significant reservoir of bacteria for constant contamination of water and food, i.e. they can cause infections and intoxications. Due to the association of biofilm with possible contamination of water systems and indirect contamination of food during

washing with such water, it is very important to examine the ability of bacteria to form biofilm at ambient temperatures and temperatures of warm-blooded organisms. Higher water temperatures and stagnant flow in the poultry water system increase bacterial growth and biofilm formation (Maharjan et al., 2017).

Studies have reported increased biofilm formation at higher water temperatures (Kadam et al., 2013; Bonsaglia et al., 2014).

Poimenidou et al. (2016) observed that 20°C was more supportive to biofilm formation than 37°C, which is the house temperature during the second half of the bird growth period.

Untreated drinking water on farms may be more susceptible to the presence of pathogens in the drinking system. Even treated drinking water was susceptible to biofilm formation in the poultry drinking system during the flock growth period. Therefore, cleaning the drinking system between two rotations becomes a mandatory practice for improvement (Raut et al., 2024).

The poor efficacy of disinfectants against the polymer matrix of biofilms favors better protection of bacteria on their surfaces, despite disinfection practices (Muhterem-Uyar et al., 2015). Flushing the supply system with disinfected water releases substances and thus removes the developed biofilm.

The aim of the study is to determine the microbiological status of water originating from poultry farms, as well as to examine the biofilm production ability of isolated pathogenic bacteria from water, which bacteria very easily and efficiently create in the aquatic ecosystem, and which can significantly contribute to the creation of antimicrobial resistance.

MATERIALS AND METHODS

The material for testing is 150 water samples originating from broiler farms located on the territory of the Republic of Srpska, which were sampled in 2023, of which 93 samples (62%) originated from the water supply, 44 samples (29.33%) from well water and 13 samples (8.67%) from spring water. Most of the well and spring water samples were treated with disinfectants immediately before being released into the water supply system.

Sampling was carried out in such a way that all fittings were removed from the tap, the water was allowed to flow for 2-3 minutes, after which the tap was closed and the tap was disinfected with alcohol and sterilized with a flame, and the water was allowed to flow again for 2-3 minutes. After that, the water was poured into darkened sterile glass bottles with a volume of 1 liter, with water being poured into them in an amount of $\frac{3}{4}$ of the bottle's volume. The samples were transported at a temperature of $5\pm 3^\circ\text{C}$, and the testing was carried out within 6 hours of sampling.

Laboratory water testing was performed using the following standard methods:

- number of microorganisms at 22°C and 37°C according to BAS EN ISO 6222 (ISBIH, 2003a),
-

- number of intestinal enterococci according to BAS EN ISO 7899-2 (ISBIH, 2003b),
- the number of coliform bacteria and *Escherichia coli* according to BAS EN ISO 9308 (ISBIH, 2018).

The Rulebook on the Health Safety of Drinking Water Intended for Human Consumption (Regulation, 2017) establishes testing parameters and microbiological criteria (Table 1).

Table 1 Test parameters and microbiological criteria

Parameter	Purified water	Unpurified water
	Criterion	
Number of microorganisms at 22°C	100CFU/1 ml	300CFU/1 ml
Number of microorganisms at 37°C	20CFU/1 ml	100CFU/1 ml
Intestinal enterococci	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
Coliforms	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml

The biofilm production assay was performed according to the method of Stepanovic et al. (2000), with a modification in the concentration of the tested inoculum of 10^6 CFU/ml, which was prepared in brain-heart infusion broth (BHI). Three tests were performed for each strain, i.e. three wells were inoculated with 100 μ l of BHI for each strain. The microtiter plates were then incubated for 24 hours at 25°C and 37°C. After incubation, the contents of the plate were removed by pipetting, and each well was washed three times with buffer. Adherent bacteria were fixed by air drying. After drying, 100 μ l of crystal violet dye from a Gram staining kit (Biomérieux, France) was pipetted into each well. Staining lasted 15 minutes, after which the plates were washed three times with buffer and air-dried. To resuspend the stain, 100 μ l of 30% acetic acid (Zorka, Šabac) was added to each well. The absorbance was read on an automated ICN Flow Titrek Multiscan Plus reader at λ of 570 nm. Three negative samples were used on each microtiter plate, i.e. three wells were inoculated with sterile TXY broth. Based on this, the cut-off value of the ODc absorbance was determined, which was calculated as the mean value of the three negative samples increased by three standard deviations. Isolates were designated as non-biofilm producers, and weak, moderate and strong producers based on the following formulas:

- $OD < OD_c$ (non-producers)
- $OD_c < OD < 2 \times OD_c$ (weak producers)
- $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$ (moderate producers)
- $4 \times OD_c < OD$ (strong producers).

The reference strain *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 was used as a positive control.

In the analysis of the obtained microbiological test results, we used descriptive statistical parameters (Excel, Microsoft Office 2019). To compare the degree of biofilm production between the two groups of bacteria, Fisher's exact probability test was used. To compare the biomass of the formed biofilm in the two groups of tested bacteria, T test was used. The value $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological testing of water samples

Microbiological water quality is defined as the maximum acceptable number or concentration of bacteria that do not pose a health hazard (Regulation, 2020), and *Escherichia coli* and intestinal enterococci are considered basic parameters.

The production and distribution of water with biological stability can only be achieved by adequate monitoring and control of microbiological processes during water treatment and distribution (Prest et al., 2016).

The assessment of microbiological compliance of drinking water samples was carried out in relation to the Rulebook on the Health Safety of Drinking Water Intended for Human Consumption (Regulation, 2017).

Microbiological testing determined 64.67% satisfactory and 35.33% unsatisfactory drinking water samples, and the results by water category are shown in Table 2.

Table 2 Microbiological test results by category

Water category	Satisfactory samples %	Unsatisfactory samples %
Water supply network	74.19	25.81
Well water	54.55	45.45
Spring water	30.77	69.23

Water is essential for organisms to maintain their basic metabolic activities, and the quality of drinking water is undoubtedly linked to animal health and performance (El-Katcha et al., 2018; Guo et al., 2022).

Kalaba et al. (2018) found that 26.20% of water samples obtained from animal farms were unsatisfactory in the Republic of Srpska for the period from 2015 to 2017, and Golić et al. (2023) found that 45.82% of water samples were unsatisfactory during 2022. The results obtained are within the scope of previous research, and indicate variations from year to year, which indicates a constant significant microbiological contamination of drinking water, and both the inadequacy of the disinfection process and inconsistency in its application.

Table 3 shows unsatisfactory samples according to test parameters.

Table 3 Unsatisfactory samples according to test parameters

Parameter	Unsatisfactory samples %
Number of microorganisms at 22°C	12.67
Number of microorganisms at 37°C	15.33
Intestinal enterococci	13.33
<i>Escherichia coli</i>	20
Coliforms	20

The results indicate that apart from *Escherichia coli*, there were no other coliforms in the tested water samples. In a study of microbiological analysis of water on farms in the Republic of Srpska (Kalaba et al., 2015), it was found that 62.66% of water samples obtained from animal farms were unsatisfactory and that the most common causes of irregularities were related to enterococci, *Escherichia coli* and the number of microorganisms at 22°C and 37°C. Similar results were obtained by Golić et al. (2023). The results obtained in our study confirm the previous ones, only with a significantly lower percentage per tested parameter.

Table 4 shows the unsatisfactory results of microbiological testing in relation to the total number of samples by category, according to the test parameter.

Table 4 Unsatisfactory microbiological test results in relation to the total number of samples by category according to the test parameter

Parameter	Unsatisfactory samples in %		
	Water supply network	Well water	Spring water
Number of microorganisms at 22°C	8.60	13.64	38.46
Number of microorganisms at 37°C	11.83	18.18	30.77
Intestinal enterococci	9.68	13.64	38.46
<i>Escherichia coli</i>	13.98	18.18	69.23
Coliforms	13.98	18.18	69.23

In the period 2018-2020, it was found that 23.41% of water samples originating from animal farms were unsatisfactory (Golić et al., 2021), of which 10.19% of samples were due to the presence of intestinal enterococci, and 6.44% of samples were due to the presence of *Escherichia coli*. In our study, similar results were obtained for intestinal enterococci, but significantly more favorable results were obtained for *Escherichia coli*. The highest percentage of unsatisfactory samples refers to spring water, possibly because it is not disinfected, unlike tap and well water.

Table 5 shows the results of microbiological testing by category and testing parameter in relation to unsatisfactory samples.

Table 5 Microbiological testing results by category and testing parameter in relation to unsatisfactory samples

Parameter	Unsatisfactory samples in %		
	Water supply network	Well water	Spring water
Number of microorganisms at 22°C	33.33	30	55.56
Number of microorganisms at 37°C	45.83	40	44.44
Intestinal enterococci	37.50	30	55.56
<i>Escherichia coli</i>	54.17	40	100
Coliforms	54.17	40	100

Faecal coliforms were reported in water samples from 20 farms (50%), which were above the maximum acceptable level (Jafari et al., 2006). Amaral et al. (1995) found that 90% of well water samples and 100% of spring water samples had bacteria indicative of faecal contamination. Kalaba et al. (2018) found that 63.40% of unsatisfactory samples were due to increased the number of microorganisms at 22°C, 54.90% were due to increased the number of microorganisms at 37°C, 58.80% were due to the presence of intestinal enterococci, 31.40% were due to the presence of coliforms and 19% were due to the presence of *Escherichia coli*. Also, our study found a high percentage of unsatisfactory drinking water samples in relation to the testing parameters.

Biofilm formation testing of *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* isolates

A total of 30 strains of *Escherichia coli* and 20 strains of *Enterococcus spp.*, which were isolated from all samples during the basic microbiological analysis, were tested. The test was performed in a way that the total amount of biofilm biomass was determined based on the extinction of the dye. The strains were marked as non-biofilm producers, and as weak, moderate and strong producers based on negative controls. Among *Escherichia coli* strains, a statistically significant difference was observed in the biomass of the formed biofilm, as well as in the degree of biofilm production at the tested incubation temperatures (Table 6). At room temperature, more than half of the isolates (17/30, i.e. 56.7%) showed strong biofilm production, while at the temperature of warm-blooded organisms, moderate producers were the most common (16/30, i.e. 53%). When it comes to the biomass of the biofilm created, it was observed that the isolates at room temperature created a biomass of 0.63 ± 0.71 , compared to a statistically highly significantly lower biofilm production at the temperature of warm-blooded organisms of 0.21 ± 0.12 ($p=0.003$)

Table 6 Biofilm production of *Escherichia coli* isolates at two tested temperatures in %

Strain	25°C	37°C	p
Non-producer	3 (10%)	2 (6.7%)	0.001*
Weak producer	7 (23.3%)	7 (23.3%)	
Moderate producer	3 (10%)	16 (53.3%)	
Strong producer	17 (56.7%)	5 (16.7%)	

On the other hand, enterococci showed an equal ability to produce biofilm, whether the degree of biofilm production (Table 7) or biomass was examined. At both temperatures, they produced almost the same biofilm biomass (0.07 at the lower and 0.09 at the higher temperature) ($p>0.05$).

Table 7 Biofilm production of *Enterococci spp.* isolates at two tested temperatures

Strain	25°C	37°C	p
Non-producer	8 (40%)	2 (10%)	0.06
Weak producer	8 (40%)	8 (40%)	
Moderate producer	3 (15%)	9 (45%)	
Strong producer	1 (5%)	1 (5%)	

When comparing the biofilm-forming ability of these two bacteria at the above temperatures, it is observed that *Escherichia coli* was a significantly better biofilm producer in terms of both biomass and biofilm production rate at 25°C ($p=0.001$, $p=0.00018$) (Figure 1-4).

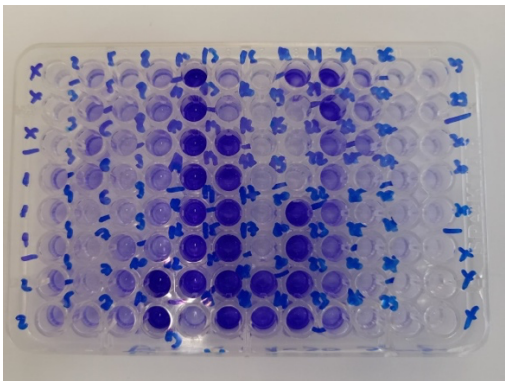


Figure 1 *Escherichia coli* biofilm production at 25°C

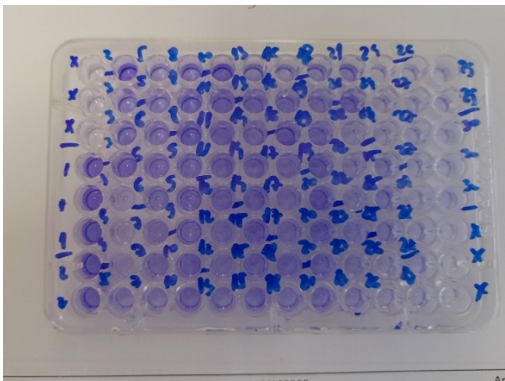


Figure 2 *Escherichia coli* biofilm production at 37°C

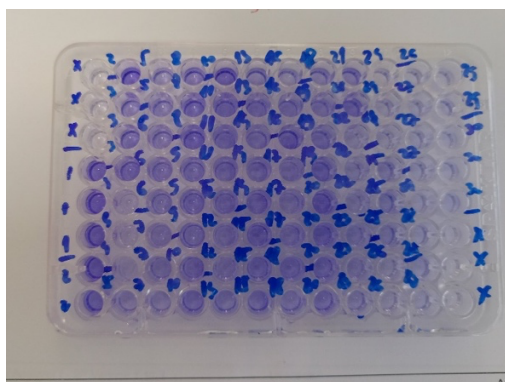


Figure 3 Biofilm production of *Enterococcus* spp. at 25°C

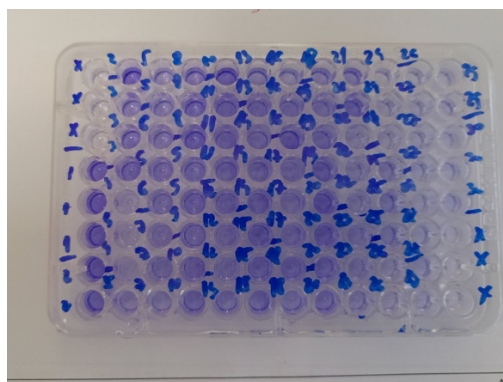


Figure 4 Biofilm production of *Enterococcus* spp. at 37°C

At room temperature, most *Escherichia coli* isolates were moderate and strong producers (20/30, i.e. 66.7%), while most *Enterococcus* isolates were non-producers and weak producers (16/20, i.e. 80%). This is clearly visible when looking at the biofilm biomass, as the extinction of the dye was tenfold higher at 25°C. At the temperature of warm-blooded organisms, both tested microorganisms produced biofilm equally well when comparing the degree of biofilm production, as well as the biomass created ($p > 0.05$, $p > 0.05$).

Biofilm formation is a universal protective mechanism for microorganisms in adverse conditions. Aquatic ecosystems in nature or in the water supply network represent an excellent environment for the formation of microbial communities in the form of biofilms, which bacteria themselves create after reaching a critical number on a certain substrate or medium (Liu et al., 2016). In our study, *Escherichia coli* strains showed significantly better biofilm formation at lower temperatures compared to higher incubation temperatures, as well as compared to enterococcal isolates. Our results are in agreement with the work of Ingle et al. (2011) and Maltholouti et al. (2018) who also demonstrated better biofilm production at 25°C, especially if rich nutrient media with neutral pH were used, as was the case in our case. Important virulence factors that contribute to biofilm formation are curly pili and cellulose production. Pili are important both as an adhesion factor and as a structural protein element, and cellulose is the dominant polysaccharide component. The gene for cellulose production is inactivated at 37°C, while it is activated at temperatures below 30°C (Uhlich et al., 2014). This could also explain our results. On the other hand, temperature had no effect on biofilm formation of enterococcal strains, even when temperatures in the range of 10-45°C were used (Marinho et al., 2013), which is in agreement with our study. The same authors showed that the addition of higher glucose concentrations led to differences in biofilm formation at different temperatures. In future work, it would be interesting to determine whether the strains used in our study will also exhibit similar behavior. Also, Jahan et al. (2014) showed that better biofilm production at 25°C compared to 37°C is primarily species-dependent and that *Enterococcus faecalis*

isolates were better producers compared to *Enterococcus faecium*, which poses an important task for us to perform speciation of our isolates in order to determine which species were dominant in our study.

CONCLUSION

Drinking water on broiler farms has a very unfavorable microbiological status, especially from the point of view of the adverse impact of pathogenic bacteria on this sensitive category of poultry. The water disinfection process needs to be considered and significantly improved, especially considering the significant use of well and spring water, and favorable conditions for biofilm formation in water supply systems. *Escherichia coli* strains showed significantly better biofilm formation at 25°C compared to 37°C, as well as in relation to *Enterococcus spp.* isolates. Since we did not examine the effect of nutrients on the effect of biofilm production and did not have complete identification of the isolates, we cannot give a definitive answer as to why the enterococcal isolates formed significantly less biofilm, except to assume that they, as gram-positive bacteria, are less voluminous and were not induced to produce biofilm to the extent that gram-negative *Escherichia coli* isolates did. Similar studies have not been conducted and no data are available, so in future studies we need to detect virulence factors in both species that are important during biofilm formation, in order to clarify their behavior in a sessile community in aquatic ecosystems.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Scientific and Technological Development and Higher Education of Republic of Srpska (contract No. 19.032/961-101/23).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Amaral L. A., Nader Filho A., Isa H., Barros L. S. S. (2001): Qualidade higiênico-sanitária e demanda de cloro da água de dessedentação de galinhas de postura coletadas em bebedouros tipo nipple e taça. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 3(3):249-255.
- Amaral L. A., Nader Filho A., Rossi Junior O. D., Penha L. H. C. (1995): Características microbiológicas da água utilizada no processo obtenção do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 15(2/3):85-88.
- Amaral L. A., Rossi Junior O. D., Cardoso V. (1999): Qualidade higienico-sanitária da água de bebedouros pendular e nipple utilizados na criação de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 1(2):145-148.
- Ballou A. L., Ali R. A., Mendoza M. A., Ellis J. C., Hassan H. M., Croom W. J., Koci M. D. (2016): Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. *Front. Vet. Sci.*, 3:(2).
- Bauer, A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 36:493-496.
-

- Bell D. D. (2002): Consumption and quality of water. In Commercial Chicken Meat and Egg Production, 5th edition. Eds. D. D. Bell., W. D. Weaver, Jr. Springer, 411-430.
- Bonsaglia E. C. R., Silva N. C. C., Fernandes A. J., Araujo J. P. J., Tsunemi M. H., Rall V. L. M. (2014): Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35:386-391.
- Bowler P., Murphy C., Wolcott R. (2020): Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-5.
- Butcher G. D., Jacob J. P., Mather F. B. (1999): Common poultry diseases, Fact Sheet PS-47. University of Florida, 1-19.
- Edberg S. C., Rice E. W., Karlin R. J., Allen M. J. (2000): *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88:106-116.
- El-Katcha M., Soltan M. A., El-Shobokshy S. A., Kasser M. (2018): Impact of water acidification or magnetic treatment on growth performance, health and oxidative status of broiler chicks challenged by *Salmonella enteritidis*. *Alex. J. Vet. Sci.*, 59:154-168.
- Englert S. (1998): Produção de frangos de corte. In: Avicultura: tudo sobre raças, manejo e alimentação. 7^ª. Eds. S. Englert, Guaíba: Agropecuária, 94-151.
- Fridrich B., Krcmar D., Dalmacija B., Molnar J., Pesic V., Kragulj M., Varga N. (2014): Impact of wastewater from pig farm lagoons on the quality of local groundwater. *Agricultural Water and Management*, 135:40-53.
- Gama M. S. Q. (1995): Água, que cura, que nutre, que mata. *Aves & Ovos*, 30-33.
- Golić B., Kalaba V., Nedić D. (2021): Review of microbiological analysis of drinking water for animals in the Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina) during the period 2018-2020. *Veterinary Journal of Republic of Srpska, Banja Luka*, 21(1-2):37-49.
- Golić B., Knežević D., Pećanac B. (2023): Assessment of the microbiological status of drinking water on animal farms. In XIV International Scientific Agricultural Symposium „Agrosym 2023“. Proceedings, 1086-1093.
- Guo Y. J., Wang Z. Y., Wang Y. S., Chen B., Huang Y. Q., Li P., Tan Q., Zhang H. Y., Chen W. (2022): Impact of drinking water supplemented 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid in combination with acidifier on performance, intestinal development, and microflora in broilers. *Poult. Sci.*, 101(3).
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Koster O., Egli T. (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, 42:269-277.
- Hijnen W. A. M., van Veenendaal D. A., van der Speld W. H. M., Visser A., Hoogenboezem W., van der Kooij D. (2000): Enumeration of faecal indicator bacteria in large volumes using in site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research*, 34:1659-1665.
- Hoefel D., Monis P. T., Grooby W. L., Andrews S., Saint C. P. (2005): Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J. Appl. Microbiol.*, 99:175-186.
-

- Ingle, D. J., Clermont, O., Skurnik, D., Denamur, E., Walk, S. T., & Gordon, D. M. (2011). Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp. *Applied and environmental microbiology*, 77(8):2695-2700.
- ISBIH (2003a): Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 6222.
- ISBIH (2003b): Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 7899-2.
- ISBIH (2018): Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 9308-1.
- Jafari R. A., Fazlara A. M. (2006): Govahi An investigation into *Salmonella* and fecal coliform contamination of drinking water in broiler farms in Iran. *Int. J. Poult. Sci.*, 5:491-493.
- Jahan M., Holley R. A. (2014): Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *International Journal of Food Microbiology*, 170:65-69.
- Kadam S. R., den Besten H. M. W., van der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R., Abee T. (2013): Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 165:259-264.
- Kalaba V., Golić B., Ilić T. (2018): Microbiological safety of water in primary production. In 29. Counselling of veterinary of Serbia, Book of Article and Abstracts, 326.
- Kalaba V., Golić B., Kasagić D., Nedić D., Dojčinović S. (2015): Determining the microbiological safety of water on farms in the Republic of Srpska. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 15(2):259-271.
- Liu S., Gunawan C., Barraud N., Rice S. A., Harry E. J., Amal R. (2016): Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*, 50(17), 8954-8976.
- Macari M. (1997): Qualidade da água e bebouros para frangos de corte: tipos, vantagens e desvantagens. In: Conferência Apinco'97 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas: Facta, 121-143.
- Maharjan P., Clark T., Kuenzel C., Foy M. K., Watkins S. (2016): On-farm monitoring of the impact of water system sanitation on microbial levels in broiler house water supplies. *J. Appl. Poult. Res.*, 25:266-271.
- Maharjan P., Dey S., Huff G., Zhang W., Phillips G. K., Watkins S. (2017): Effect of chlorine treatment on inhibition of *E coli* serogroup O2 incorporation into 7-day-old biofilm on polyvinylchloride surface. *Poult. Sci.*, 96:2862-2870.
- Mathlouthi A., Pennacchietti E., De B. D. (2018): Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 10(4(39)):129-132.
- Marinho A. R., Martins P. D., Ditmer E. M., d'Azevedo P. A., Frazzon J., Van der Sand S. T., Frazzon A. P. G. (2013): Biofilm formation on polystyrene under different
-

- temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:423-426.
- Meza H. (1989): Controle de qualidade na produção de frangos de corte. *Avicultura & Suinocultura Industrial*, 80:38-44.
- Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A. S., Hernandez M., Kapetanakou A. E., Kuchta T., Manios S. G., Melero B., Minarovicova J., Nicolau A. I., Rovira J., Skandamis P. N., Jordan K., Lazaro D. R., Stessl B., Wagner M. (2015): Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51:94-107.
- Oviedo E. O. (2006): Important factors in water quality to improve broiler performance. *N. Carolina Poult. Industry Joint Area Newsletter*, 1:7-8.
- Poimenidou S. V., Chrysadaku M., Tzakoniati A., Bikouli V. C., Nychas G. J., Skandamis P. N. (2016): Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 237:164-171.
- Prest E. I., Hammes F., van Loosdrecht M. C. M., Vrouwenvelder J. S. (2016): Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges. *Front. Microbiol.*, 7:45.
- Raut R., Kilonzo Nthenge A., Aniume T., Basnet A., Watkins S., Maharjan P. (2024): Impacts of on-farm water sanitation practices on microbial hygiene in poultry waterlines and efficacy of sodium hypochlorite-based product on foodborne pathogens. *Journal of Applied Poultry Research*, 33(3).
- Regulation (2017): Rulebook on the Health Safety of Drinking Water Intended for Human Consumption. The Official Gazette of Republic of Srpska, 88/17.
- Regulation (2020): Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (recast). Official Journal of European Union, L435.
- Sasakova N., Veselitz-Lakticova K., Hromada R., Chvojka D., Koscco J., Ondrasovic M. (2013): Contamination of individual sources of drinking water located in environmentally polluted Central Spis Region (Slovakia). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3:262-265.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. A. (2000): Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-9.
- Uhlich G. A., Chen C.-Y., Cottrell B. J., Nguyen L.-H. (2014): Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 354(2):133-141.
- Vital M., Dignum M., Magic-Knezev A., Ross P., Rietveld L., Hammes F. (2012): Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.*, 46:4665-4676.
- WHO (2008): Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd ed., Vol. 1. World Health Organisation.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401102R

UDK 637.13.04/.07:637.12.055(497.11)

Оригинални научни рад

ПРОЦЕНА КВАЛИТЕТА МЛЕКА И ПРОИЗВОДА ОД МЛЕКА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ

Радослава Савић РАДОВАНОВИЋ^{1*}, Силвана СТАЈКОВИЋ¹, Јасна КУРЕЉУШИЋ², Анђела ЦВЕТКОВИЋ³

¹ Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

² Научни институт за ветеринарство Србије, Београд, Србија

³ Југоинспект Београд АД, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Радослава Савић Јовановић, mimica@vet.bg.ac.rs

Сажетак

Млеко као животна намирница има велики нутритивно-физиолошки значај и посебно место заузима у исхрани деце, старих и болесних особа. Ферментисани производи су лако сварљиви и препоручују се особама с развијеном интолеранцијом на лактозу. Сматра се да свакодневно уношење ових производа омогућава успостављање и нормално функционисање интестиналног тракта. Ови производи се добијају ферментацијом под утицајем бактерија млечне киселине. У ферментисане производе спадају јогурт, кисело млеко, кефир и воћни јогурт, као и друге врсте ферментисаних млека. Производња безбедне и квалитетне хране је нешто чему тежи свака држава и због тога се доносе закони и прописи који дефинишу стандарде квалитета које намирнице морају испуњавати како би се нашле на трпези потрошача. Млеко спада у основне намирнице у исхрани становништва и његов квалитет мора бити контролисан. Циљ овог рада је био да се испита квалитет млека и производа од млека у промету и из увоза на подручју Републике Србије. Материјал је представљао 70 узорак млека и производа од млека. Параметри квалитета млека и производа су испитани према Правилнику о квалитету производа од млека и стартер култура (Службени гласник Републике Србије 33/2010, 69/2010, 33/2013, 34/2014). За испитивање су коришћене следеће стандардне методе: SRPS ISO 19660, SRPS EN ISO 8968-4, SRPS ISO 22662/IDF 198. Добијени резултати су показали да је 95,71% испитаних узорак млека и производа од млека испуњавало критеријуме прописане регулативом. Параметри квалитета су задовољавајући, али се препоручује праћење квалитета млека и производа од млека, јер неки од производа нису испуњавали критеријуме прописане правилником или нису имали одговарајућу произвођачку декларацију.

Кључне речи: квалитет, млеко, производи од млека.

УВОД

Млеко као животна намирница због нутритивно-физиолошки значаја заузима посебно место у исхрани деце, старих и болесних особа. Млеко и производи од млека у исхрани људи, осим високовредних протеина, обезбеђују и лако сварљиве масти, лактозу, минералне материје, витамине А и D. Од витамина, млеко садржи B2, B6, B12, А, D и К, а када су минерали у питању то су калцијум, фосфор, калијум и магнезијум. Производи од млека, као што су ферментисани, који се добијају ферментацијом под утицајем бактерија млечне киселине, лако су сварљиви и препоручују се особама с развијеном интолеранцијом на лактозу. Сматра се да свакодневно уношење ових производа омогућава успостављање и нормално функционисање интестиналног тракта. У ферментисане производе спадају јогурт, кисело млеко, кефир и воћни јогурт, као и друге врсте ферментисаних млека.

Неопходно је обезбедити деци не само хранљиву већ и безбедну и квалитетну исхрану како би се подржао њихов раст и развој и спречиле болести у одраслом добу (Armas и сар., 2016). Упркос томе што су невероватно хранљиви и вредан извор есенцијалних макро- и микронутријената за људско здравље, млеко и млечни производи представљају значајне здравствене проблеме, посебно за бебе и децу (Towhida и сар., 2021).

Млеко и млечни производи су познати као најисплативија храна животињског порекла у земљама са ниским до средњим приходима (Nyokabi и сар. 2021; Alonso и сар., 2018; Muunda и сар., 2021).

Производња млека у Републици Србији је једна од најзначајнијих пољопривредних грана. Потрошња млека и производа од млека износи око 190 kg годишње по глави становника. У последњих десет година примећен је пад производње пастеризованог млека и маслаца, производња павлаке и сира је у константном расту, док количина производње ферментисаних производа од млека осцилира (РЗС, 2023).

Пошто су млеко и млечни производи повезани са болестима које се преносе храном, потрошачи су забринути за квалитет млечних производа и услове производње (Walstra и сар., 2006). Обезбеђивање квалитета и безбедности млека и прерађевина захтева контролу различитих фаза ланца прераде млека, од муже краве до потрошње (Babegе и сар., 2020; Tegegn, 2021).

Производња безбедне и квалитетне хране је нешто чему тежи свака држава и због тога се доносе закони и прописи који дефинишу стандарде квалитета које намирнице морају да испуњавају како би се нашле у промету и на трпези потрошача. Млеко спада у основне намирнице у исхрани становништва и његов квалитет мора бити контролисан. У Републици Србији услови у погледу квалитета термички обрађеног млека и производа од млека прописани су Правилником о квалитету производа од млека и starter култура (Пропис, 2010). Овим правилником дате су класификација, категоризација и назив производа,

физичка, хемијска, физичко-хемијска и сензорна својства, као и састав производа, врста и количина сировина, додатака и других супстанци које се употребљавају у производњи и преради производа, елементи битних технолошких поступака који се примењују у производњи и преради производа и додатни захтеви за означавање производа.

Циљ овог рада био је да се испита квалитет млека и производа од млека у промету и из увоза на подручју Републике Србије.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Материјал је представљао укупно 70 узорак: термички обрађено млеко ($n=8$) и производи од млека (сиреви $n=42$, кајмак $n=2$, маслац $n=3$, јогурт и кисело млеко $n=7$, урда $n=1$, млеко у праху $n=3$, сурутка у праху $n=3$, баскија $n=1$), који су потицали с подручја Републике Србије, као и методом случајног узорковања с граничног прелаза Хоргош. Сви узорци из увоза били су пореклом из Француске, Данске, Пољске, Литваније, Словачке, Немачке и Мађарске. На Слици 1 означено је порекло испитаних узорак термички обрађеног млека и производа од млека са територије Републике Србије.



Слика 1 Порекло узорак млека и производа од млека с територије Републике Србије

У циљу испитивања квалитета термички обрађеног млека и производа од млека, испитани су следећи наведени параметри:

- пастеризовано млеко: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу, садржај азота и сува материја,

- сир: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу и сува материја,
- јогурт и кисело млеко: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу и рН вредност (потенциометријски),
- маслац: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу и сува материја,
- млеко у праху: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу, сува материја и садржај азота,
- сурутка у праху: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу, сува материја и садржај азота,
- кајмак: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу, сува материја, рН вредност (потенциометријски) и садржај NaCl титриметријски по Volhardu,
- урда: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу и сува материја,
- баскија: садржај млечне масти ацидобутирометријски по Герберу и сува материја.

Испитивање узорака вршено је следећим стандардним методама:

- SRPS ISO 11870 (ИСС, 2014),
- SRPS ISO 8968-4 (ИСС, 2016),
- SRPS ISO 6731 (ИСС, 2013).

За статистичку обраду резултата су коришћени GraphPad ver.3 и MS Excel ver.10, а за статистичко поређење вредности, које не потпадају под нормалну дистрибуцију, примењен је Mann-Whitney U тест.

РЕЗУЛТАТИ

Добијени резултати су показали да су од 235 анализа, 232 анализе (98,7%), односно 95,71% испитаних узорака млека и производа од млека испуњавале критеријуме прописане регулативом (Слика 2).



Слика 2 Резултати испитивања квалитета млека и производа од млека

Резултати испитивања параметара садржаја млечне масти и садржаја протеина у узорцима пастеризованог млека приказани су у Табели 1. Млечна маст се кретала од 2,8 % до 3,6 %, док је садржај протеина измерен у опсегу 2,9 % до 3,3 %. Добијене су мале варијације окарактерисане коефицијентом варијације за млечну маст 10% и за садржај протеина 4,6%.

Табела 1 Резултати испитивања квалитета пастеризованог млека

Параметар	Млечна маст (%)	Садржај протеина
Број узоракa	8	8
Мин.	2,8	2,9
Макс.	3,6	3,3
$\bar{X}$	3,1	3,1
SD	0,31	0,14
CV (%)	10	4,6

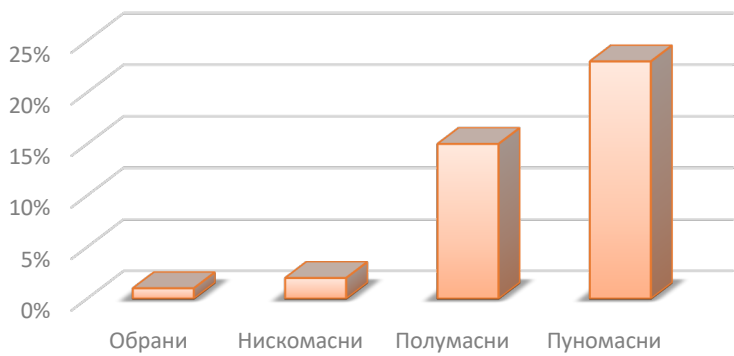
Резултати испитивања квалитета 42 узорка сира, који су потицали из Србије и из увоза, приказани су у Табели 2.

Табела 2 Збирни приказ испитивања параметара квалитета сира из Србије и увоза

Параметар	Млечна маст (%)	Млечна маст у сувој материји	Садржај воде у безмасној материји	Сува материја
Број узоракa	42	42	30	42
Мин.	1	4,75	49,06	21,06
Макс.	31	58,66	82	66,15
$\bar{X}$	22,71	42,59	60,39	51,18
SD	7,489	9,756	7,351	12,48
CV (%)	32,98	22,91	12,17	24,39

У збирном приказу резултата испитивања параметара квалитета сирева (Табела 2), сиреви нису класификовани према начину добијања, обраде и зрења, па су због тога резултати испитивања праћени знатним варирањем. Из резултата одређивања параметара квалитета сирева запажа се да се садржај млечне масти кретао од 1% до 31%, садржај млечне масти у сувој материји од 4,75% до 58,66%, садржај воде у безмасној материји сира од 49% до 82%, док је сува материја сира имала вредности између 21% и 66%. Коефицијент варијације је највећи за

садржај млечне масти (32,98%), а најмањи за садржај воде у безмасној материји (12,17%).
Резултати испитивања параметра удела млечне масти у сувој материји су показали да су узорци сирева припадали обраним сиревима (1%), нискомасним сиревима (2%), полумасним сиревима (15%) и пуномасним сиревима (23%), док ниједан узорак није категорисан као екстрамасни сир (Слика 3).



Слика 3 Дистрибуција узорака сирева према уделу млечне масти у сувој материји

Табела 3 Резултати испитивања параметара квалитета сирева пореклом из Србије

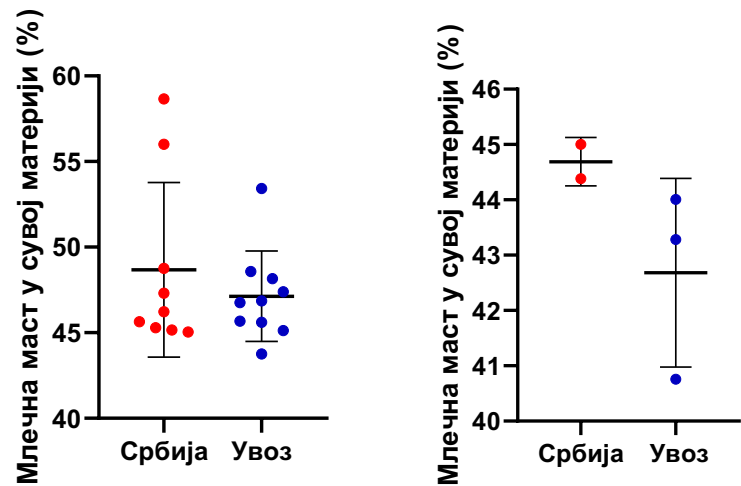
Параметар	Млечна маст (%)	Млечна маст у сувој материји	Садржај воде у безмасној материји	Сува материја
Број узорака	29	29	19	29
Мин.	1	4,75	53,56	21,06
Макс.	30	58,66	82	61,35
$\bar{X}$	20,74	41,02	61,99	47,54
SD	8,232	11,27	7,671	13,26
CV (%)	39,70%	27,47%	12,38%	27,89%

Табела 4 Резултати испитивања параметара квалитета сирева пореклом из увоза

Параметар	Млечна маст (%)	Млечна маст у сувој материји	Садржај воде у безмасној материји	Сува материја
Број узорака	13	13	11	13

Мин.	25	40,76	49,06	48,67
Макс.	31	53,42	69,36	66,15
$\bar{X}$	27,10	46,11	57,62	59,31
SD	1,79	3,09	6,12	4,29
CV (%)	6,60	6,70	10,63	7,23

На Слици 4 и 5 приказана је дистрибуција млечне масти у сувој материји полумасних и масних сирева пореклом из Србије и из увоза.



Слика 4 и 5 Приказ дистрибуције млечне масти у сувој материји полумасних (лево) и масних сирева (десно) пореклом из Србије и из увоза ($\bar{X} \pm SD$).

У Табели 5 приказани су резултати одређивања параметара квалитета ферментисаних производа (јогурт и кисело млеко).

Табела 5 Резултати испитивања параметара квалитета јогурта и киселог млека

Параметар	Млечна маст (%)	pH
Број узорака	7	7
Мин.	0,5	4,2
Макс.	11	4,4
$\bar{X}$	4,5	4,3
SD	3,4	0,078
CV (%)	76	1,8

У Табели 6, 7, 8, 9 и 10 приказани су резултати испитивања параметара квалитета за производе од млека (маслац, млеко и сурутка у праху, кајмак, урда).

Табела 6 Резултати испитивања параметра квалитета маслаца

Параметар	Млечна маст (%)	Сува материја без масти	Влага (%)
Број узорака	3	3	3
Мин.	84	1,1	11
Макс.	88	1,9	15
$\bar{X}$	86	1,4	13
SD	2,3	0,44	1,9
CV (%)	2,6	32	15

Табела 7 Резултати испитивања параметара квалитета млека у праху

Параметар	Млечна маст (%)	Протеини суве материје без масти	Садржај воде	Садржај протеина
Број узорака	3	3	3	3
Мин.	1	29	2,6	23
Макс.	28	35	4	33
$\bar{X}$	15	33	3,2	27
SD	14	3,5	0,71	5,3
CV (%)	93	11	22	19

Табела 8 Резултати испитивања параметара квалитета сурутке у праху

Параметар	Садржај протеина	Садржај влаге	Млечна маст (%)	Пепео (%)	pH 10% раствора
Број узорака	3	3	3	3	3
Мин.	3,2	1,9	0,3	2,8	6,3
Макс.	11	3	0,8	7,3	6,5
$\bar{X}$	7,5	2,3	0,6	5,7	6,4
SD	4	0,58	0,26	2,5	0,06
CV (%)	54%	25%	44%	44%	0,94%

Табела 9 Резултати испитивања квалитета кајмака

Параметар	Млечна маст (%)	Млечна маст у сувој материји	Сува материја	pH	Садржај соли (NaCl)
Број узоракa	2	2	2	2	2
Мин.	57	81	67	6	1,2
Макс.	58	87	71	6	1,2
X	58	84	69	6	1,2
SD	0,71	4,4	2,8	0,01	0,03
CV (%)	1,2	5,2	4,0	0,12	2,4

Табела 10 Резултати испитивања квалитета урде

Млечна маст (%)	Млечна маст у сувој материји	Сува материја
6.5	26,4	24,6

ДИСКУСИЈА

Из приказаних резултата види се да су сви узорци пастеризованог млека испуњавали критеријуме квалитета прописане регулативом и да ниједан узорак није садржавао мање млечне масти од наведеног на декларацији производа. Садржај протеина одговара просечном садржају протеина крављег млека. Према анализи из 2022. године, производња млека у Републици Србији се стабилизовала на око 1,5 милијарди литара захваљујући повећању производње по једном грлу. Међутим, пошто је смањен број грла почела је да опада и производња. У 2021. години била је мања производња за 100 милиона литара (РЗС, 2023).

Сви испитани узорци сира су задовољили критеријум прописан Правилником у погледу суве материје (Пропис, 2010), с варирањем у погледу количине суве материје од око 24%, што се објашњава да су узорци били различите врсте сирева, који се добијају на различите начине (Табела 2). Као параметар који најбоље описује разноврсност сирева на тржишту истиче се садржај млечне масти који је варирао скоро 33%. Ова разлика потиче, осим од карактеристика производње, и од захтева тржишта, где у последње две деценије расте потражња за сиревима од обраног млека са смањеним садржајем млечне масти. Анализом резултата испитивања узоракa сирева пореклом из Србије запажа се да се садржај млечне масти кретао од 1% до 30%, садржај млечне масти у сувој материји од 4,75% до 58,66%, садржај воде у безмасној материји сира од 53,56% до 82%, док се сува материја сира кретала од 21% до 61%. Коефицијент варијације је и у овом случају највећи за садржај млечне масти (39,70%), а најмањи за садржај воде у безмасној

материји сира (12,38%) (Табела 3). Уколико се упореде сиреви пореклом из Републике Србије и сиреви из увоза, примећује се различита заступљеност у врстама сирева. Сви испитани увозни сиреви имају удео млечне масти у сувој материји преко 40, односно преко 25% млечне масти, па према подели спадају у полумасне и масне сиреве (Слика 3, 4 и 5). Како Правилник дефинише различите услове квалитета сира у зависности од производних карактеристика, може се закључити да сви испитивани сиреви имају адекватан квалитет. Од испитиваних карактеристика, статистички значајна разлика установљена је међу сиревима домаћих произвођача и из увоза у погледу садржаја млечне масти ($U=98,5$ $p=0,013$), као и у садржају суве материје ($U=62$ $p=0,0003$). Ови резултати се односе на све испитиване узорке и потврђују разлику између типова, порекла и врсте увезених и домаћих сирева. Како су сви испитани увозни сиреви припадали категорији полумасних и масних сирева, уколико се упореде с истом категоријом сирева произведеним у Србији, у параметрима квалитета нема статистички значајне разлике ($p>0,05$). У ранијим истраживањима у Србији испитивани су и сиреви с пијаца, где су утврђени параметри квалитета сирева произведених од термички обрађеног млека и од некуваног млека (Радовановић и сар., 2016). Резултати тих анализа сирева индивидуалних пољопривредних произвођача су показали мање вредности за суву материју од узорака испитаних у овом раду, тј. код сирева од некуваног млека $36,87\pm6,10\%$, док је код сирева од куваног млека тај удео очекивано нешто већи, тј. $41,13\pm4,97\%$. Маст у сувој материји таквих сирева била је $56,39\pm9,36\%$ код сирева од некуваног млека, док је код сирева од куваног млека удео млечне масти био $42,63\pm17,68\%$, што представља очекивано смањење, јер мали произвођачи с куваног млека одвајају кајмак пре подсиравања. Наши резултати показују просечну количину млечне масти од $41,02\pm11,27\%$, што је резултат који се мора посматрати у контексту адекватне групе сирева према количини млечне масти. Сви испитани узорци ферментисаних производа су испуњавали критеријуме квалитета прописане Правилником (Пропис, 2010). Добијене вредности за испитиване параметре су значајно ниже од оних које су добили Golić и сар. (2014).

Параметри испитивања квалитета маслаца били су садржај млечне масти, воде и сува материја (Табела 6). Узроци су представљали маслац у блоку, смрзнуту маслац и маслац од пастеризоване павлаке. Сви узорци су задовољили критеријуме правилника, али су сви имали и вредности поменутих параметара веће од минималних прописаних Правилником, што сами произвођачи могу искористити у циљу продужења рока трајања и адекватне понуде на тржишту. Параметар који је највише варирао у испитиваним узорцима маслаца је садржај суве материје без масти (коэффициент варијације 32%), што само осликава различите технолошке поступке складиштења производа, као што је замрзавање. Садржај млечне масти је имао веома низак коэффициент варијације у испитаним узорцима (2,6%), што доказује конзистентност у стандардизованој производњи

маслаца. Добијени резултати су у складу с резултатима истраживања Pădureț (2021).

Сви узорци млека у праху за испитивање потицали су из увоза (Данска и Француска). Два узорка су декларисана као пуномасно млеко у праху, док је један узорак дефинисан као обрано млеку у праху. Један од наведених узорака декларисан као пуномасно млеко у праху садржавао је 14,5% млечне масти, што није у складу с одредбама Правилника, који дефинише минимум од 20% млечне масти. Овај производ би морао да буде декларисан као обрано млеко у праху, јер овако не одговара декларацији. Остали параметри квалитета свих испитаних производа били су у складу с произвођачким декларацијама (Табела 7).

Сви узорци сурутке у праху потицали су из увоза (Француска, Литванија и Словачка). Од свих испитаних производа од млека у циљу испитивања квалитета, највећи удео производа, који није задовољио критеријуме потицао је од узорака сурутке у праху. Од свих испитаних узорака, тек је трећина (33,3%) задовољила све прописане критеријуме (Табела 8). Неслагање с Правилником уочено је у критеријуму садржаја протеина, где су само узорци из Француске имали преко 11% протеина, што представља прописани минимум. Сви остали параметри квалитета производа свих испитаних узорака сурутке у праху били су у складу са захтевима Правилника.

Резултати испитивања кајмака обухватила су два узорка младог кајмака с региона Златибора и оба су задовољила услове квалитета прописане Правилником. Резултати испитивања једног узорка урде (Табела 10) испуњавали су критеријуме квалитета прописане Правилником. Сличне резултате испитивања квалитета 14 узорака урде у Црној Гори наводе Војанић Расовић и сар. (2017), који су доказали да је средња вредност садржаја суве материје урде била 42,85%, садржај масти 21,74%, протеина 13,66%, соли 2,67%, масти у сувој материји 50,77%, масти у сувој материји 21,11% и садржаја воде у сувој материји слободне масти 49,67%. Баскија представља зrelu грудy у процесу добијања сирева од пареног теста као што је качкаваљ. Параметри квалитета баскије нису дефинисани Правилником, па нема постављених граница за параметре квалитета овог производа.

ЗАКЉУЧАК

Добијени резултати су показали да је 95,71% испитаних узорака млека и производа од млека испуњавало критеријуме прописане регулативом. Један узорак млека у праху није одговарао декларацији због мањег садржаја млечне масти, али би испунио критеријуме да је дефинисан као обрано млеко у праху, јер су остали испитани параметри одговарајући. Два узорка сурутке у праху нису испунила критеријум минималног садржаја протеина, док су остали параметри били одговарајући. Параметри квалитета баскије нису дефинисани регулативом, па нема постављених граница за параметре квалитета овог производа. Параметри квалитета су у највећем броју испитаних узорака задовољавајући, али ће се

праћење квалитета млека и производа од млека наставити кроз мониторинг, јер неки производи нису испуњавали критеријуме прописане регулативом или нису имали одговарајућу произвођачку декларацију.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор број 451-03-66/2024-03/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Alonso S., Muunda E., Ahlberg S., Blackmore E., Grace D. (2018): Beyond food safety: socio-economic effects of training informal dairy vendors in Kenya. *Global Food Secur.*, 18:86-92.
- Armas L. A., Frye C. P., Heaney R. P. (2016): Effect of cow's milk on human health. In *Beverage Impacts on Health and Nutrition*. Eds. T. Wilson, T. Norman, Springer, 131-150.
- Babege K., Eshetu M., Kassa F. (2020): Hygienic production practices and microbial quality of cow milk in Cheha district of Gurage zone, southern Ethiopia. *Open J. Anim. Sci.*, 10:592-607.
- Bojanic Rasovic M., Nikolić N., Rasovic R. (2017): Quality of "urda" obtained after production of montenegrin semi-hard cheese. *Food Research*, 1:166-170.
- Golić B., Nedić D., Pećanac B., Dojčinović S., Stojiljković M., Nedić S. (2014): Quality of white sheep cheese from Stara planina. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 14(2):224-233.
- ИСС (2013): Млеко, павлака и кондензовано млеко – Одређивање укупне суве материје (референтна метода). Институт за стандардизацију Србије, SRPS ISO 6731:2013.
- ИСС (2014): Млеко и производи од млека – Одређивање садржаја масти – Опште упутство за примену бутирометријских метода. Институт за стандардизацију Србије, SRPS ISO 11870:2014.
- ИСС (2016): Млеко и производи од млека – Одређивање садржаја азота – Део 4: Одређивање садржаја протеинског и непротеинског азота и израчунавање садржаја правих протеина (референтна метода). Институт за стандардизацију Србије, SRPS ISO 8968-4:2016.
- Muunda E., Mtimet N., Schneider F., Wanyoike F., Dominguez-Salas P., Alonso S. (2021): Could the new dairy policy affect milk allocation to infants in Kenya? A best-worst scaling approach. *Food Pol.*, 102043.
- Nyokabi S., Pieterl A. L., Imke J. M., Luke K., Emmanuel M., Bockline O. B., Johanna L., Bernard B., Simon J. O. (2021): Milk quality and hygiene:
-

- knowledge, attitudes and practices of smallholder dairy farmers in central Kenya. *Food Control*, 130(108303).
- Pădureț S. (2021): The Effect of Fat Content and Fatty Acids Composition on Color and Textural Properties of Butter. *Molecules*, 26(15):4565.
- Пропис (2010): Правилник о квалитету производа од млека и стартер култура. Службени гласник Републике Србије, 33/2010, 69/2010, 43/2013, 34/2014.
- Радовановић С. Р., Катић В., Здравковић Н. (2016): Физичкохемијске карактеристике и квалитет меких сирева на тржишту београдских пијаца. XXI Саветовање о биотехнологији са међународним учешћем, Зборник радова, 731-737.
- РЗС (2023): Пољопривреда, рибарство и шумарство. Републички завод за статистику Србије.
- Tegegn A. (2021): Microbial safety, physical properties and chemical composition of cow milk in Ethiopia, A Review. *Glob. J. Anim. Sci. Res.*, 9(1):51-75.
- Towhida K., Eaftekhar A. R., Shafayat M. J., Fahad M. Q., Mishuk S., Omar F. M. (2021): Assessment of biochemical and microbial quality of different market and raw milk available in Chattogram metropolitan area, Bangladesh. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 8(2):80-85.
- Walstra P., Wouters J. T. M., Geurts T. J. (2006): In Dairy Science and Technology. Taylor & Francis Group, LLC.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401115R

UDK 637.13.04/.07:637.12.055(497.11)

Original Scientific Paper

ASSESSMENT OF THE QUALITY OF MILK AND DAIRY PRODUCTS IN THE REPUBLIC OF SERBIA

**Radoslava Savić RADOVANOVIĆ^{1*}, Silvana STAJKOVIĆ¹, Jasna
KURELJUŠIĆ², Anđela CVETKOVIĆ³**

¹ University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

² Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

³ Jugoinspekt Beograd AD, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Radoslava Savić Radovanović, mimica@vet.bg.ac.rs

Summary

Milk as a foodstuff has great nutritional and physiological importance and occupies a special place in the diet of children, the elderly and sick people. Fermented products are easily digestible and are recommended for people with lactose intolerance. It is believed that the daily intake of these products enables the establishment and normal functioning of the intestinal tract. These products are obtained by fermentation under the influence of lactic acid bacteria. Fermented products include yogurt, sour milk, kefir and fruit yogurt, as well as other types of fermented milk. The production of safe and high-quality food is something that every country strives for, and that is why laws and regulations define the quality standards that food must meet in order to be on the consumer's table. Milk is one of the basic foods in the diet of the population and its quality must be controlled. The aim of this study was to examine the quality of milk and dairy products on market and from imports in the territory of the Republic of Serbia. The material included 70 samples of milk and dairy products. The quality parameters of milk and products were examined according to the Regulation on the quality of dairy products and starter cultures (Official Gazette of the Republic of Serbia 33/2010, 69/2010, 33/2013, 34/2014). The following standard methods were used for testing: SRPS ISO 19660, SRPS EN ISO 8968-4, SRPS ISO 22662/IDF 198. The obtained results showed that 95.71% of the tested samples of milk and dairy products met the criteria prescribed by the Regulation. The quality parameters are satisfactory, but it is recommended to monitor the quality of milk and dairy products, because some of the products did not meet the criteria prescribed by the Rulebook or did not have an appropriate manufacturer's declaration.

Key words: quality, milk, dairy products.

INTRODUCTION

Due to its nutritional and physiological importance, milk as a foodstuff occupies a special place in the diet of children, the elderly and sick people. Milk and dairy products in the human diet, in addition to high-value proteins, also provide easily digestible fats, lactose, minerals, vitamins A and D. Milk contains B2, B6, B12, A, D and K vitamins, as well as calcium, phosphorus, potassium and magnesium, as minerals. Dairy products, such as fermented milk products, which are obtained by fermentation under the influence of lactic acid bacteria, are easily digestible and are recommended for people with lactose intolerance. It is believed that the daily intake of these products enables the establishment and normal functioning of the intestinal tract. Fermented products include yogurt, sour milk, kefir and fruit yogurt, as well as other types of fermented milk.

It is necessary to provide children with not only nutritious but also safe and high-quality nutrition in order to support their growth and development and prevent diseases in adulthood (Armas et al., 2016). Despite being incredibly nutritious and a valuable source of essential macro- and micronutrients for human health, milk and dairy products pose significant health problems, especially for babies and children (Towhida et al., 2021).

Milk and dairy products are known as the most cost-effective foods of animal origin in low- to middle-income countries (Nyokabi et al., 2021; Alonso et al., 2018; Muunda et al., 2021).

Milk production in the Republic of Serbia is one of the most important agricultural branches. The consumption of milk and dairy products is about 190 kg per year per capita. In the last ten years, a decline in the production of pasteurized milk and butter has been observed, the production of cream and cheese is constantly growing, while the amount of production of fermented milk products fluctuates (RZS, 2023).

Since milk and dairy products are associated with food-borne diseases, consumers are concerned about the quality of milk products and the conditions of production (Walstra et al., 2006). Ensuring the quality and safety of milk and dairy products requires the control of different stages of the milk processing chain, from milking the cow to consumption (Babege et al., 2020; Tegegn, 2021).

The production of safe and high-quality food is something that every country strives for, and that is why laws and regulations define the quality standards that foods must meet in order to be on market and on consumers' tables. Milk is one of the basic foods in the diet of the population and its quality must be controlled. In the Republic of Serbia, conditions regarding the quality of thermally processed milk and milk products are prescribed by the Regulation on the quality of dairy products and starter cultures (Regulation, 2010). This Regulation provides the classification, categorization and name of the product, physical, chemical, physico-chemical and sensory properties, as well as the composition of the product, the types and quantities of raw materials, additives and other substances used in the production and processing of the product,

elements of essential technological procedures that are applied in the production and processing of the product, and additional requirements for labeling the product. The aim of this study was to examine the quality of milk and dairy products on market and from imports in the territory of the Republic of Serbia.

MATERIALS AND METHODS

The material included a total of 70 samples: thermally processed milk (n=8) and dairy products (cheese n=42, kajmak n=2, butter n=3, yogurt and sour milk n=7, “urda“ n=1, milk powder n=3, whey powder n=3, Basque n=1), which came from the territory of the Republic of Serbia, as well as by the method of random sampling from the Horgoš border crossing. All imported samples originated from France, Denmark, Poland, Lithuania, Slovakia, Germany and Hungary. Figure 1 shows the origin of the tested samples of thermally processed milk and dairy products from the territory of the Republic of Serbia.



Figure 1 Origin of milk and dairy products samples from the territory of the Republic of Serbia

In order to test the quality of thermally processed milk and dairy products, the following parameters were tested:

- pasteurized milk: milk fat content by Gerber method, nitrogen content and dry matter,

- cheese: milk fat content by Gerber method and dry matter,
- yogurt and sour milk: milk fat content by Gerber method and pH value (potentiometric),
- butter: milk fat content by Gerber method and dry matter,
- powdered milk: milk fat content by Gerber method, dry matter and nitrogen content,
- whey powder: milk fat content by Gerber method, dry matter and nitrogen content,
- kajmak: milk fat content by Gerber method, dry matter, pH value (potentiometric) and NaCl content by Volhard method,
- cottage cheese: milk fat content by Gerber method and dry matter,
- Basque: milk fat content by Gerber method and dry matter

The samples were tested using the following standard methods:

- SRPS ISO 11870 (ISS, 2014),
- SRPS ISO 8968-4 (ISS, 2016),
- SRPS ISO 6731 (ISS, 2013).

GraphPad ver.3 and MS Excel ver.10 were used for statistical processing of the results, and the Mann-Whitney U test was used for statistical comparison of values that did not have normal distribution.

RESULTS

The obtained results showed that out of 235 analyses, 232 analyzes (98.7%), or 95.71% of the tested samples of milk and dairy products met the criteria prescribed by the Regulation (Figure 2).

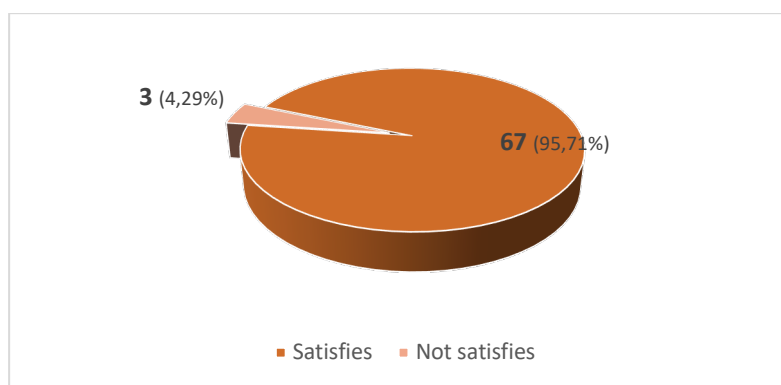


Figure 2 Results of testing the quality of milk and dairy products

The results of testing parameters of milk fat content and protein content in pasteurized milk samples are shown in Table 1. Milk fat ranged from 2.8% to 3.6%, while protein content was measured in the range of 2.9% to 3.3%. Small variations were obtained,

characterized by a coefficient of variation for milk fat of 10% and for protein content of 4.6%.

Table 1 Test results of pasteurized milk

Parameter	Milk fat (%)	Protein content
Number of samples	8	8
Min.	2.8	2.9
Max.	3.6	3.3
$\bar{X}$	3.1	3.1
SD	0.31	0.14
CV (%)	10	4.6

The results of quality testing of 42 samples of cheese, which came from Serbia and were imported, are shown in Table 2.

Table 2 A summary of the examination of cheese quality parameters from Serbia and imports

Parameter	Milk fat (%)	Milk fat in dry matter	Water content in fat-free matter	Dry matter
Number of samples	42	42	30	42
Min.	1	4.75	49.06	21.06
Max.	31	58.66	82	66.15
$\bar{X}$	22.71	42.59	60.39	51.18
SD	7.489	9.756	7.351	12.48
CV (%)	32.98	22.91	12.17	24.39

In the summary of the test results of the quality parameters of cheeses (Table 2), the cheeses are not classified according to the method of obtaining, processing and ripening, and therefore the test results are characterised with considerable variation. From the results of determining the quality parameters of the cheeses, it can be seen that the milk fat content ranged from 1% to 31%, the milk fat content in the dry matter from 4.75% to 58.66%, the water content in the fat-free cheese matter from 49% to 82%, while the dry matter of the cheese had values between 21% and 66%. The coefficient of variation is the highest for the milk fat content (32.98%), and the lowest for the water content in the fat-free matter (12.17%).

The results of testing the parameter of milk fat in dry matter showed that the cheese samples belonged to skimmed cheeses (1%), low-fat cheeses (2%), semi-fat cheeses (15%) and full-fat cheeses (23%), while no sample was categorized as extra-fat cheese (Figure 3).

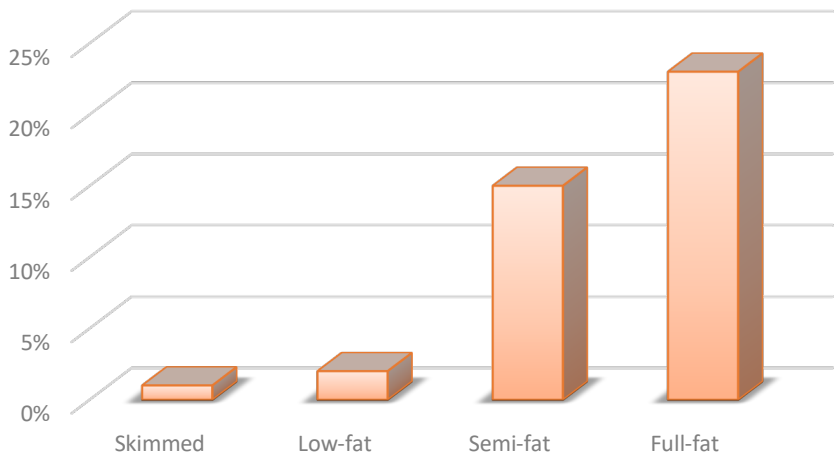


Figure 3 Distribution of cheese samples according to the share of milk fat in dry matter

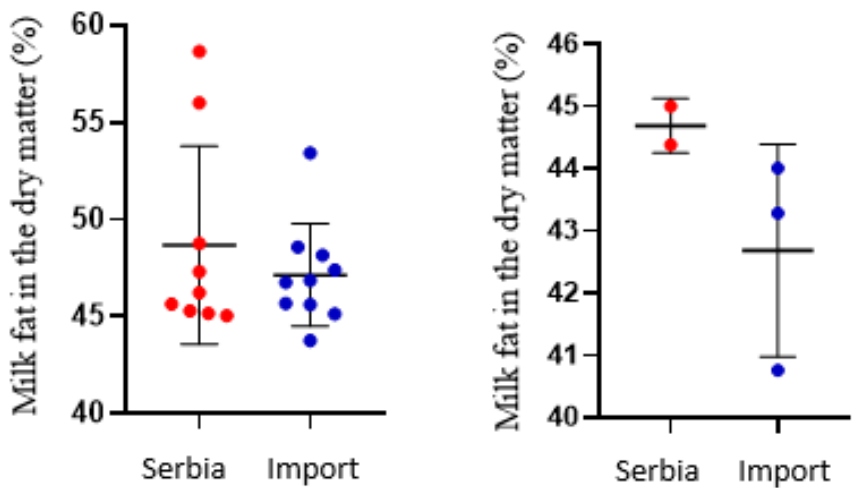
Table 3 The results of testing the quality parameters of cheeses originating from Serbia

Parameter	Milk fat (%)	Milk fat in dry matter	Water content in fat-free matter	Dry matter
Number of samples	29	29	19	29
Min.	1	4.75	53.56	21.06
Max.	30	58.66	82	61.35
$\bar{X}$	20.74	41.02	61.99	47.54
SD	8.232	11.27	7.671	13.26
CV (%)	39.70%	27.47%	12.38%	27.89%

Table 4 The results of testing the quality parameters of imported cheeses

Parameter	Milk fat (%)	Milk fat in dry matter	Water content in fat-free matter	Dry matter
Number of samples	13	13	11	13
Min.	25	40.76	49.06	48.67
Max.	31	53.42	69.36	66.15
$\bar{X}$	27.10	46.11	57.62	59.31
SD	1.79	3.09	6.12	4.29
CV (%)	6.60	6.70	10.63	7.23

Figures 4 and 5 show the distribution of milk fat in the dry matter of semi-fat and full-fat cheeses originating from Serbia and imported.



Figures 4 and 5 Presentation of the distribution of milk fat in the dry matter of semi-fat (left) and full-fat cheeses (right) originating from Serbia and imported ($\bar{X} \pm SD$).

Table 5 shows the results of determining the quality parameters of fermented products (yogurt and sour milk).

Table 5 Results of testing quality parameters of yogurt and sour milk

Parameter	Milk fat (%)	pH
Number of samples	7	7
Min.	0.5	4.2
Max.	11	4.4
$\bar{X}$	4.5	4.3
SD	3.4	0.078
CV (%)	76	1.8

Tables 6, 7, 8, 9 and 10 show the results of testing quality parameters for milk products (butter, milk and whey powder, kajmak, cottage cheese).

Table 6 Test results of the butter quality parameter

Parameter	Milk fat (%)	Fat-free dry matter	Moisture (%)
Number of samples	3	3	3
Min.	84	1.1	11
Max.	88	1.9	15
$\bar{X}$	86	1.4	13
SD	2.3	0.44	1.9
CV (%)	2.6	32	15

Table 7 The results of testing the quality parameters of milk powder

Parameter	Milk fat (%)	Fat-free dry matter proteins	Water content	Protein content
Number of samples	3	3	3	3
Min.	1	29	2.6	23
Max.	28	35	4	33
$\bar{X}$	15	33	3.2	27
SD	14	3.5	0.71	5.3
CV (%)	93	11	22	19

Table 8 Results of testing the quality parameters of whey powder

Parameter	Protein content	Water content	Milk fat (%)	Ash (%)	pH of 10% solution
Number of samples	3	3	3	3	3
Min.	3.2	1.9	0.3	2.8	6.3
Max.	11	3	0.8	7.3	6.5
$\bar{X}$	7.5	2.3	0.6	5.7	6.4
SD	4	0.58	0.26	2.5	0.06
CV (%)	54%	25%	44%	44%	0.94%

Table 9 Results of testing the quality of kajmak

Parameter	Milk fat (%)	Milk fat in dry matter	Dry matter	pH	Salt content (NaCl)
Number of samples	2	2	2	2	2
Min.	57	81	67	6	1.2
Max.	58	87	71	6	1.2
X	58	84	69	6	1.2
SD	0.71	4.4	2.8	0.01	0.03
CV (%)	1.2	5.2	4.0	0.12	2.4

Table 10 Results of testing the quality of “urda”

Milk fat (%)	Milk fat in dry matter	Dry matter
6.5	26.4	24.6

DISCUSSION

The presented results show that all samples of pasteurized milk met the quality criteria prescribed by the Regulation and that no sample contained less milk fat than stated on the product declaration. The protein content corresponds to the average protein content of cow's milk. According to the analysis from 2022, milk production in the Republic of Serbia has stabilized at around 1.5 billion liters thanks to the increase in production per head. However, since the number of heads was reduced, the production also began to decline. In 2021, production was 100 million liters lower (RZS, 2023).

All tested cheese samples met the criterion prescribed by the Regulation in terms of dry matter (Regulation, 2010), with a variation in the amount of dry matter of about 24%, which is explained by the fact that the samples were different types of cheese,

which are obtained in different ways (Table 2). The milk fat content, which varied by almost 33%, stands out as the parameter that best describes the variety of cheeses on the market. This difference originates, apart from the characteristics of production, and from the demands of the market, where in the last two decades the demand for cheeses made from skimmed milk with a reduced milk fat content has been growing. Analyzing the test results of cheese samples originating from Serbia, it is noted that the milk fat content ranged from 1% to 30%, the milk fat content in the dry matter from 4.75% to 58.66%, the water content in the fat-free cheese matter from 53.56% to 82%, while the dry matter of the cheese ranged from 21% to 61%. In this case, the coefficient of variation is the highest for the milk fat content (39.70%), and the lowest for the water content in the fat-free cheese (12.38%) (Table 3). If cheeses originating from the Republic of Serbia and imported cheeses are compared, different types of cheeses are represented. All tested imported cheeses have a share of milk fat in dry matter over 40, that is, over 25% of milk fat, so according to the division they are classified as semi-fat and fat cheeses (Figure 3, 4 and 5). As the Regulation defines different cheese quality conditions depending on the production characteristics, it can be concluded that all tested cheeses have adequate quality. Of the examined characteristics, a statistically significant difference was found between domestically produced and imported cheeses in terms of milk fat content ($U=98.5$ $p=0.013$), as well as in dry matter content ($U=62$ $p=0.0003$). These results refer to all tested samples and confirm the difference between the types, origins and types of imported and domestic cheeses. As all tested imported cheeses belonged to the category of semi-fat and fat cheeses, if they are compared with the same category of cheeses produced in Serbia, there is no statistically significant difference in the quality parameters ($p>0.05$). In earlier study obtained in Serbia, cheeses from markets were examined, where the quality parameters of cheeses produced from thermally processed milk and from uncooked milk were determined (Radovanović et al., 2016). The results of those analyzes of cheeses from individual agricultural producers showed lower values for dry matter than the samples tested in this study, i.e. in the case of uncooked milk cheeses, $36.87\pm6.10\%$, while in the case of cooked milk cheeses, this share is expected to be slightly higher, i.e. $41.13\pm4.97\%$. The fat in the dry matter of such cheeses was $56.39\pm9.36\%$ in uncooked milk cheeses, while in boiled milk cheeses the share of milk fat was $42.63\pm17.68\%$, which represents an expected decrease, because small producers separate the cream from boiled milk before making cheese. Our results show an average amount of milk fat of $41.02\pm11.27\%$, which is a result that must be seen in the context of an adequate group of cheeses according to the amount of milk fat. All tested samples of fermented products met the quality criteria prescribed by the Regulation (Regulation, 2010). The obtained values for the tested parameters are significantly lower than those obtained by Golić et al. (2014).

The parameters of the butter quality test were the content of milk fat, water and dry matter (Table 6). The samples were block butter, frozen butter and butter made from pasteurized cream. All samples met the criteria of the Regulation, but all of them had

values of the mentioned parameters higher than the minimum prescribed by the Regulation, which the manufacturers can use in order to extend the shelf life and adequate offer on the market. The parameter that varied the most in the examined butter samples was the content of dry matter without fat (coefficient of variation 32%), which only reflects the different technological procedures of product storage, such as freezing. The milk fat content had a very low coefficient of variation in the tested samples (2.6%), which proves the consistency in standardized butter production. The obtained results are in accordance with the results obtained by Pădureț (2021).

All milk powder samples for testing were imported (Denmark and France). Two samples were declared as whole milk powder, while one sample was defined as skimmed milk powder. One of the mentioned samples declared as whole milk powder contained 14.5% milk fat, which is not in accordance with the provisions of the Regulation, which defines a minimum of 20% milk fat. This product would have to be declared as skimmed milk powder, because it does not correspond to the declaration. Other quality parameters of all tested products were in accordance with the manufacturer's declarations (Table 7).

All whey powder samples were imported (France, Lithuania and Slovakia). Of all the tested dairy products for the purpose of quality testing, the largest share of products that did not meet the criteria came from whey powder samples. Of all the tested samples, only a third (33.3%) met all the prescribed criteria (Table 8). Disagreement with the Rulebook was observed in the criterion of protein content, where only the samples from France had over 11% protein, which represents the prescribed minimum. All other product quality parameters of all tested whey powder samples were in accordance with the requirements of the Regulation.

The results of the kajmak testing included two samples of young kajmak from the Zlatibor region, and both met the quality conditions prescribed by the Regulation. The test results of one "urda" sample (Table 10) met the quality criteria prescribed by the Regulation. Similar results of testing the quality of 14 "urda" samples in Montenegro are reported by Bojanic Rasovic et al. (2017), who proved that the mean value of the dry matter content of "urda" was 42.85%, fat content 21.74%, protein 13.66%, salt 2.67%, fat in dry matter 50.77%, fat in dry matter 21.11% and water content in dry matter of free fat 49.67%.

Basque represents a mature lump in the process of obtaining cheeses from steamed dough such as cheese. Basque quality parameters are not defined by the Regulation, so there are no set limits for the quality parameters of this product.

CONCLUSION

The obtained results showed that 95.71% of the tested samples of milk and dairy products met the criteria prescribed by the Regulation. One sample of milk powder did not correspond to the declaration due to a lower content of milk fat, but it would have met the criteria if it had been defined as skimmed milk powder, because the other tested

parameters were appropriate. Two samples of whey powder did not meet the criteria of minimum protein content, while the other parameters were adequate. The quality parameters of Basque are not defined by Regulation, so there are no set limits for the quality parameters of this product. The quality parameters are satisfactory in the majority of tested samples, but monitoring of the quality of milk and dairy products will continue through monitoring, because some products did not meet the criteria prescribed by the Regulation or did not have an appropriate manufacturer's declaration.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (contract No. 451-03-66/2024-03/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest

REFERENCES

- Alonso S., Muunda E., Ahlberg S., Blackmore E., Grace D. (2018): Beyond food safety: socio-economic effects of training informal dairy vendors in Kenya. *Global Food Secur.*, 18:86-92.
- Armas L. A., Frye C. P., Heaney R. P. (2016): Effect of cow's milk on human health. In *Beverage Impacts on Health and Nutrition*. Eds. T. Wilson, T. Norman, Springer, 131-150.
- Babege K., Eshetu M., Kassa F. (2020): Hygienic production practices and microbial quality of cow milk in Cheha district of Gurage zone, southern Ethiopia. *Open J. Anim. Sci.*, 10:592-607.
- Bojanic Rasovic M., Nikolić N., Rasovic R. (2017): Quality of "urda" obtained after production of montenegrin semi-hard cheese. *Food Research*, 1:166-170.
- Golić B., Nedić D., Pećanac B., Dojčinović S., Stojiljković M., Nedić S. (2014): Quality of white sheep cheese from Stara planina. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 14(2):224-233.
- ISS (2013): Milk, cream and evaporated milk – Determination of total solids content (Reference method). Institute for standardization of Serbia, SRPS ISO 6731:2013.
- ISS (2014): Milk and milk products – Determination of fat content – General guidance on the use of butyrometric methods. Institute for standardization of Serbia, SRPS ISO 11870:2014.
- ISS (2016): Milk and milk products – Determination of nitrogen content – Part 4: Determination of protein and non-protein nitrogen content and true protein content calculation (Reference method). Institute for standardization of Serbia, SRPS ISO 8968-4:2016.
-

- Muunda E., Mtimet N., Schneider F., Wanyoike F., Dominguez-Salas P., Alonso S. (2021): Could the new dairy policy affect milk allocation to infants in Kenya? A best-worst scaling approach. *Food Pol.*, 102043.
- Nyokabi S., Pieternel A. L., Imke J. M., Luke K., Emmanuel M., Bockline O. B., Johanna L., Bernard B., Simon J. O. (2021): Milk quality and hygiene: knowledge, attitudes and practices of smallholder dairy farmers in central Kenya. *Food Control*, 130(108303).
- Pădureț S. (2021): The Effect of Fat Content and Fatty Acids Composition on Color and Textural Properties of Butter. *Molecules*, 26(15):4565.
- Regulation (2010): Regulation on the quality of dairy products and starter cultures. Official Gazette of the Republic of Serbia, 33/2010, 69/2010, 43/2013, 34/2014.
- Radovanović S. R., Katić V., Zdravković N. (2016): Physicochemical characteristics and quality of soft cheeses on the Belgrade market. XXI Conference on Biotechnology with International Participation, Proceedings, 731-737.
- RZS (2023): Agriculture, Fisheries and Forestry. Statistical Office of the Republic of Serbia.
- Tegegn A. (2021): Microbial safety, physical properties and chemical composition of cow milk in Ethiopia, A Review. *Glob. J. Anim. Sci. Res.*, 9(1):51-75.
- Towhida K., Eaftekhar A. R., Shafayat M. J., Fahad M. Q., Mishuk S., Omar F. M. (2021): Assessment of biochemical and microbial quality of different market and raw milk available in Chattogram metropolitan area, Bangladesh. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 8(2):80-85.
- Walstra P., Wouters J. T. M., Geurts T. J. (2006): In Dairy Science and Technology. Taylor & Francis Group, LLC.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401128R

UDK 631.147:636.5]:338.3(497.11)

Оригинални научни рад

ЖИВИНАРСКА ПРОИЗВОДЊА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ – ТРЕНУТНО СТАЊЕ И ПЕРСПЕКТИВЕ

Стамен РАДУЛОВИЋ^{1*}, Драган ШЕФЕР¹, Радмила МАРКОВИЋ¹, Дејан ПЕРИЋ¹, Јасна СТЕВАНОВИЋ², Бојан СТОЈАНОВИЋ³, Александра ИВЕТИЋ⁴, Драго НЕДИЋ¹

¹Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

²Привредна комора Србије, Београд, Србија

³Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, Београд, Србија

⁴Институт за примену науке у пољопривреди, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Стамен Радуловић, stamenradulovic@gmail.com

Сажетак

Живинарска производња је током последњих деценија од споредне делатности у сеоским домаћинствима израсла у високо специјализовану индустријску грану сточарске производње која има велики потенцијал за развој привреде многих земаља. У Републици Србији тренутно се гаји укупно 21,6 милиона јединки живине, од чега 12,5 милиона бројлера и 7,5 милиона кокошака носилца. У поређењу са резултатима Пописа пољопривреде из 2018. године, уочљив је пад укупног броја живине за 7,3%, односно за чак 23,25% у односу на резултате из 2012. године. Производња јаја је на нивоу нешто вишем од 1,5 милијарди комада што представља минимални забележен ниво производње јаја у току претходних десет година. Са друге стране, током 2023. године, остварена је производња живинског меса од 127 000 т, односно на 10% вишем нивоу у односу на претходну годину и 13,6% више у односу на петогодишњи просек. Неопходни су озбиљни напори у структурном реформисању овог сектора пољопривреде, али и руралних средина, у смислу јачања њихове економске ефикасности и конкурентности.

Кључне речи: живинарска производња, исхрана, бројлери, носилце.

УВОД

Захваљујући биолошким карактеристикама живине (висока репродуктивна способност, брз пораст, кратак генерацијски интервал и ефикасно искоришћавање хране) развој живинарске производње у свету, као и код нас, последњих деценија ишао је у правцу њеног интензивирања. То се највише односи на кокошке, које представљају основ савремене индустријске производње, али и на ћурке, које су заступљене у далеко мањем броју. Створени су нови и оплемењени стари хибриди високог генетског потенцијала, што је за

резултат имало значајно скраћивање дужине трајања това, брже полно сазревање јединки, краће време проношења и дужи период експлоатације. Међутим, треба напоменути да селекцијски рад усмерен ка добијању оваквих јединки није могао да прође без проблема. То се у првом реду односи на њихову смањену отпорност, већу учесталост настанка метаболичких поремећаја, веће захтеве у погледу услова неге и држања, високе потребе у хранљивим материјама и неопходност коришћења хранива добре биолошке вредности и сварљивости (Kleyn и сар., 2021). Без обзира на све изазове са којима се суочава, живинарска производња је током последњих деценија од споредне делатности у сеоским домаћинствима израсла у високо специјализовану индустријску грану сточарске производње која омогућава да се у релативно кратком временском периоду произведу значајне количине висококвалитетних производа попут меса и јаја, али и перја, органског ђубрива и пратећих производа који остају након клања и обраде трупова. Због тога, као и брзог обрта капитала који пружа, она има велики потенцијал за развој привреде многих земаља. Дијететска својстава меса и висока нутритивна вредности јаја, као и њихова релативно ниска тржишна цена чине ове производе прихватљивим од стране свих култура и нација, а уједно врло пожељним и прикладним намирницама у свакодневној исхрани људи (Марковић и Балтић, 2018).

Тренутно стање у живинарској производњи

На основу резултата пописа пољопривреде из 2023. године (РЗС, 2023), у Републици Србији гаји се укупно 21,6 милиона јединки живине (21.604.693), од чега 12,5 милиона бројлера (12.468.831) и 7,5 милиона кокошака носиља (7.489.642). У односу на претходну, 2022. годину, укупан број живине мањи је 3,6%, при чему је број кока носиља смањен за 5,2%. Међутим, овај негативан тренд знатно је израженији уколико се анализирају резултати пописа пољопривреде извршених 2012. и 2018. године (РЗС, 2012; РЗС, 2018). Тако је 2018. године укупан број живине износио 23.184.408, са падом од 7,3%, односно за чак 23,25% када је у питању 2012. година (укупан број живине тада је износио 26.627.308).

Посматрано по регионима, у Републици Србији живина се највише гаји у Војводини, са укупно 9.676.620 јединки, (што представља 45% укупног броја), након чега следе Шумадија и Западна Србија, Јужна и Источна Србија и Београдски регион.

Структура гајене живине према врстама указује да су кокошке доминантно заступљене са 98% (бројлери 58%, а коке носиље 35%), док учешће патака, ћурака и гусака износи 0,5%, 0,4% и 0,3%, наведеним редоследом. У односу на петогодишњи просек, евидентан је пад броја ћурака (-25%) и патака (-14%), док је број гусака у порасту (+43%), захваљујући, пре свега, великом порасту броја гусака у 2023. у односу на 2022. годину, за чак 35 хиљада јединки (+150%).

Власници живине су готово у потпуности регистровани као породична газдинства (220.324), уз врло мали број правних лица (147) и предузетника (44). Интересантно је пак да правна лица располажу са више од 8,5 милиона јединки живине (8.553.613), односно приближно 40% укупног броја живине. Исто тако, евидентно је и укрупњавање газдинстава која се баве живинарском производњом. Наиме, број газдинстава која имају до 50 јединки, пре пет година (РЗС, 2018) чинио је 23% укупног броја газдинства, док је сада ово учешће на нивоу од 16%. Истовремено, заступљеност газдинстава која имају преко 5.000 јединки је са 58% увећана на 71,5%. Изнети резултати говоре у прилог чињеници да живинарска производња све више добија индустријски карактер и захтева корпоративни приступ.

Процењује се да укупна индустријска производња хране за животиње у нашој земљи на годишњем нивоу износи нешто преко 1,4 милиона тона, од чега храна за живину узима учешће од 33%. У Табели 1 представљени су подаци о оствареној производњи потпуних, допунских и предсмеша за исхрану живине у последње четири године (РЗС, 2023).

Табела 1 Индустријска производња хране за живину у Републици Србији

Индустријска производња хране за живину (у тонама)	Остварена производња/година			
	2021.	2022.	2023.	2024.*
Потпуне смеше за живину	441.463	456.217	489.734	308.473
Допунске смеше за живину	7.911	6.862	8.220	5.371
Предсмеше за живину	2.223	1.963	1.207	737

*јануар-јул

Економски показатељи производње

Од укупне вредности пољопривредне производње у Републици Србији у 2019. години, сточарство је обухватало око 29%, са вредношћу од 1,49 милијарди ЕУР, што представља 15% више у поређењу са 2015. годином. Вредност производње у сточарству посматрана по врсти животиња била је следећа: производња говеда износила је 275,5 милиона ЕУР, свиња 540,4 милиона ЕУР, живине 127,9 милиона ЕУР, а оваца и коза 90,2 милиона ЕУР (РЗС, 2020). Према подацима из Економских рачуна пољопривреде у Републици Србији, у периоду од 2012. До 2022. године, у структури вредности сточарске производње просечно узгој стоке учествује са 68,2%, а производи сточарства са 31,8%. У узгоју стоке, у посматраном периоду, просечно највеће учешће има узгој свиња (51,8%), а потом следи узгој говеда (27,0%), живине (12,4%), оваца и коза (8,6%) и узгој коња (0,2%).

Две главне линије производње у живинарству односе се на узгој бројлера и производњу конзумних јаја и представљају најзаступљеније гране сточарства на пољопривредним газдинствима у Републици Србији. Од десет газдинстава свих

типова, готово седам узгаја живину. Истовремено, живинарство је највише индустријализована грана пољопривреде, где се чак 37,3% грла живине узгаја на свега 225 пољопривредних газдинстава која имају статус правног лица и предузетника. По вредности производње, живинарство заузима треће место у сточарству са уделом од 12%. Према званичним подацима Статистичког годишњака Републике Србије за 2020. годину, производња кокошијих јаја и бројлера учествује са 4,9% у укупној вредности пољопривредне производње у 2019. години. Очигледно је да значај живинарства расте како на светском тржишту, тако и на тржишту Републике Србије (Scanes, 2007).

У односу на 2022. годину, цена бројлера у 2023. години је 7% нижа, док је 19,7% виша у поређењу са просечном петогодишњом ценом (Табела 2). Велики утицај на то имају цене хране за животиње и енергената, које су значајно порасле у 2022. години, као и цене месних прерађевина од живинског меса, које се у великој мери увозе. Истовремено, повећано клање и већа понуда меса, условили су нижу цену меса на тржишту.

У Табели 2 приказане су просечне годишње откупне цене произвођача живине за период 2014-2023. година (РЗС, 2023).

Табела 2 Просечне годишње откупне цене произвођача живине за период 2014-2023. година

Година	Откупне цене у РСД/kg	Откупне цене у ЕУР/kg
2014.	121,27	1,03
2015.	112,91	0,94
2016.	111,98	0,91
2017.	111,76	0,92
2018.	104,71	0,89
2019.	95,57	0,81
2020.	96,53	0,82
2021.	112,88	0,96
2022.	141,74	1,21
2023.	132,00	1,13
Индекс 2023/22	93,13	93,29
Индекс 2023/18-22	119,69	120,17

У спољнотрговинској размени живинског меса у протеклом периоду бележи се вишегодишњи дефицит, уз присутан растући тренд. Вредност извоза живинског меса у 2023. години је за 5,7% виша него претходне године, што је за 20% изнад нивоа просечне петогодишње вредности извоза. Током 2023. године увезено је живинско месо у вредности 12% вишој него претходне године, односно чак 61% вишој од просечне петогодишње увозне вредности ове врсте производа. У Табели

3 приказани су подаци спољнотрговинске размене живинског меса у периоду од 2019 до 2023. године. (РЗС, 2023).

Табела 3 Спољнотрговинска размена живинског меса (еквивалент масе трупа)
(000 ЕУР)

Година	2019.	2020.	2021.	2022.	2023.
Извоз	16.827	16.425	17.549	19.832	20.978
Увоз	35.348	37.655	43.821	59.925	67.164
Салдо	-18.521	-21.230	-26.272	-40.093	-46.186

Цена јаја је током 2023. године повећана 13% у односу на претходну годину, достигавши ниво чак 52% виши ниво од просечне петогодишње цене (Табела 4). Значајан утицај на цену јаја имале су цене сточне хране и енергената, које су значајно повећане током 2022. и 2023. године, уз истовремени инфлаторни притисак. Јаја се из Републике Србије извозе искључиво у Босну и Херцеговину, Црну Гору и Северну Македонију, док се производи од јаја увозе у великим количинама из држава чланица Европске Уније (ЕУ), упркос чињеници да у Републици Србији постоје два одобрена објекта за прераду јаја („Таково” из Инђије и „Меланж” из Ваљева).

У Табели 4 приказане су просечне годишње откупне цене произвођача конзумних јаја за период 2014-2023. година (РЗС, 2023).

Табела 4 Просечне откупне годишње цене произвођача конзумних јаја за период 2014-2023. година

Година	Цене у и РСД/ком	Цене у EUR/ком
2014.	8,24	0,07
2015.	7,79	0,06
2016.	7,69	0,06
2017.	8,55	0,07
2018.	7,70	0,07
2019.	8,04	0,07
2020.	7,99	0,07
2021.	8,22	0,07
2022.	11,80	0,10
2023.	13,38	0,11
Индекс 2023/22	113,39	113,59
Индекс 2023/18-22	152,91	153,52

Најважнији проблеми који оптерећују живинарску производњу

С обзиром да је набавка квалитетног приплодног или товног материјала основни корак у живинарској производњи, најпре, треба навести чињеницу да у нашој земљи до данас нажалост није створен ни један хибрид, већ је производња заснована само на увозу приплodних грла и јаја из европских земаља. Она се набављају преко приватних фирми које углавном размишљају о профиту, док су квалитет и проблеми до којих то може довести код наших фармера занемарени. Увезена јаја су понекад изван класе, тако да након њиховог инкубирања и одгоја приплодног подмлатка бива формирано родитељско јато, које у току производног циклуса константно даје лошије производне резултате (Јокић и сар., 2004).

У сличним околностима (као и произвођачи родитељских јата) налазе се и фармери који се баве товом бројлера и ћурића или производњом конзумних јаја. Наиме, због нестабилног тржишта, понуда једнодневне пилаци (за тов или будућих носиља) доста варира у току године, а самим тим и њихова цена. Нажалост, код нас је још увек присутна и стара навика, да се одустаје од производње уколико се на уложени не може зарадити још један динар.

Због неуређености тржишта цене меса, јаја и хране за живину значајно варирају у току једне године. Неретко се дешава да цена хране не прати цену меса и јаја и обрнуто. Такође, не врши се ни корекција цене меса на тржишту када се цена утовљеног пилета на фарми мења (повећава или смањује). Чест је случај да се пилетина из увоза (код наших домаћица окарактерисана као „надувана, пуна воде”) продаје по нижој цени од домаће, квалитетно произведене, као и то да масни и мршав труп, ситно и крупно јаје, на тржишту имају исту цену (Јокић и сар., 2023). То у највећој мери нарушава успостављање добре сарадње између произвођача хране за животиње, фармера и прерађивачке индустрије. По завршетку производног циклуса (това или производње конзумних јаја), јавља се још један велики проблем, како утовљена грла или конзумна јаја пласирати на тржиште и по којој цени. То је препуштено самим произвођачима, који су технички неопремљени и без организованог наступа. Нажалост, они често морају да продају своје производе по ниској цени, јер сваким даљим продужавањем производње улазе у још већи финансијски проблем.

Треба рећи и то да и сами фармери (углавном мањи индивидуални произвођачи) носе велики део одговорности, јер, да ли због незнања, несавесности, или просто игнорисања упутства за употребу ветеринарских лекова, њих користе у току периода носивости, или до самог краја тога, што за последицу има појаву резидуа у месу и јајима. Иако у нашој земљи постоји веома добар програм контроле наведених материја, без подизања свести самих произвођача о значају правилне употребе лекова, овај проблем се никада не може у потпуности решити. Не сме се заборавити ни податак да смо по броју канцерогених обољења међу водећим земљама у Европи (Јокић и сар., 2004). Због сличних пропуста, а у трци за профитом по сваку цену, не тако давно у свету су се десили велики ломови (случај канцерогеног диоксида у Европи и САРС-а у Азији), када је дошло до масовног

уништавања на стотине милиона утовљене пилаци. (Ghimpețeanu и сар., 2014; Lam и сар., 2003).

Услед све оштрије тржишне конкуренције произвођачи су принуђени да проблеме са којима се сусрећу покушавају да реше самостално, без помоћи и савета стручњака. Тако се живинарском производњом данас углавном баве особе које не познају у довољној мери ову област, а на својим фармама немају ангазоване агрономе и ветеринаре. Томе додатно доприноси чињеница да се они, баш због недостатка знања, углавном придржавају устаљених технологија, на које су навикли (јер се плаше увођења иновација), а које су у производњи већ одавно превазиђене и напуштене (Радуловић и сар., 2024).

Данас су у употреби различити програми за формулацију obroка, који поред хемијског састава и препорука за одређену врсту и категорију живине, узимају у обзир и цену хранива, као и бројне друге параметре као што су баланс електролита, пуферски и антиоксидативни капацитет хране. Међутим, набавка квалитетног програма захтева и ангажовање стручног лица које ће њиме руководити. На терену су познати бројни примери где су фармери самостално, због постизања ниже цене смеше, користили јефтинија хранива лошијег квалитета у високом проценту, а затим остварили врло лоше производне резултате. Исто тако, они често прихватају тзв. теренске рецептуре које су дале добар ефекат на одређеној фарми, не узимајући при томе у обзир разлике које постоје између коришћених хибрида, зоохигијенских услова или проблема који су присутни у њиховом објекту. Грешке се могу јавити и код самих дизајнера (програмера), који не познају област исхране животиња, тако да њихови програми често немају добру употребну вредност, већ захтевају додатни мануелни рад нутрициониста (Радуловић и сар., 2018).

Често се на терену велича храна иностраних произвођача, иако постоје сви предуслови да се храна истог, чак и бољег квалитета произведе од домаћих сировина, с обзиром да у погледу оспособљености нимало не заостајемо за њиховим стручњацима. Исто тако, на тржишту је присутан и велики број адитива из увоза, а неким од њих се често приписују и нереална својства. Уколико, њихови ефекти нису проверени у производним условима који су уобичајени за нашу земљу, они тада углавном представљају само лепо презентоване податке на беспрекорно дизајнираном маркетиншком материјалу (флајеру). Неретко се у једној истој смеши због „људског фактора” непотребно користи већи број додатака са истим начином деловања, што знатно повећава њену цену коштања. Важно је напоменути да адитиви никада не треба да буду коришћени као замена за неадекватне услове смештаја, нестручно руковођење исхраном, грешке начињене у инкубаторским станицама и лош генетски потенцијал грла.

Секторска SWOT анализа

На основу извршене анализе стања по секторима у пољопривреди и у руралном развоју добијени су подаци и други инпути који омогућују израду SWOT анализе (енгл. Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats - предности, слабости, прилике, претње). На прегледан начин, SWOT табелом су систематизована сазнања о предностима и могућностима унапређења стања у овом сектору пољопривреде и у домену руралног развоја, која упозоравају на слабости и претње са којима се агропривреда и рурална подручја убудуће могу срести (Табела 5 и 6). Ове информације представљају основу за систематизацију циљева, мера и активности Стратегије и пратећих докумената, те отуда служе као водич доносиоцима политичких одлука (Пропис, 2014; Пропис, 2023).

Табела 5 SWOT анализа за сектор меса

СНАГЕ	Довољна производња сточне хране
	Задовољавајући број радне снаге
	Постојање великог броја образовних и научних институција
	Добра регионална заступљеност саветодавних служби
СЛАБОСТИ	Низак финансијски капацитет сектора
	Уситењена производња и мале производне јединице
	Недовољна едукација произвођача и малих прерађивача меса
	Недовољан ниво усклађености са стандардима (добробит животиња, безбедност хране и заштита животне средине)
	Застарела технологија, објекти, машине и опрема
	Слабе вештине управљања фармом
	Недостатак ефикасног система за одлагање животињског отпада и биосигурности
	Недовољно коришћење обновљивих изора енергије
	Недостатак адекватне саветодавне подршке и обука
	Слаб трансфер технологије и низак ниво истраживања и развоја
МОГУЋНОСТИ	Добро стратешко и финансијско окружење на националном и нивоу ЕУ
	повећана тражња потрошача за локалним производима и кратким ланцима вредности
ПРЕТЊЕ	Честа појава епизоотских болести
	Промена цена на тржишту

Број закланих грла живине током последње деценије кретао се у просеку око 65 милиона грла, при чему је највећи број грла заклан 2019. године. У 2023. години, тај број је 7% виши него претходне године и износи 69,6 милиона грла. Број закланих грла у 2023. години већи је за 1,5% у односу на петогодишњи просек.

Просечна бруто маса закланих грла живине током 2023. године минимално је порасла, са 2,5 на 2,6 kg, док је нето маса остала непромењена у односу на 2022. годину (1,8 kg). Производња живинског меса се у претходном десетогодишњем периоду кретала у распону од 86 хиљада тона до 115 хиљада тона у 2020. (уз просечну годишњу потрошњу од 17 kg по становнику), па све до рекордних 127 хиљада тона, колико је забележено 2023. године. Током 2023. године, остварена је производња живинског меса на 10% вишем нивоу у односу на претходну годину и 13,6% више у односу на петогодишњи просек. Пораст производње живинског меса резултат је повећања клања живине, при чему је током претходне деценије приметно повећање учешћа закланих грла у кланицама у укупном броју заклане живине – од 55% закланих грла у кланицама у 2013. години до 99% закланих грла у кланицама током 2023. године (МПШВ РС, 2023). Овакви резултати говоре у прилог чињеници да живинско месо постаје производ који се полако сели из мале производње на газдинствима у велике индустријске комплексе. Почетком децембра 2019. године, у регистру одобрених објеката Управе за ветерину Републике Србије налазило се 78 одобрених објеката објеката који се бави клањем, расецањем и прерадом белог меса (живине) и то: 35 комбинованих објеката за клање, расецање и прераду живине; 21 објекат за клање живине; 22 објекта за клање и расецање живине (Пропис, 2023).

У ЕУ производња живинског меса током 2022. године наставила је да се смањује, након достигнутог рекордног нивоа 2020. године. Процењује се да је током 2022. године у ЕУ произведено око 13 милиона тона живинског меса, што је 1,5% мање у односу на производњу из 2021. године. Овакав резултат представља прекид изразито растућег тренда производње живинског меса у ЕУ до 2020. године. У 2022. години, највећи произвођачи живинског меса у ЕУ били су Пољска (21% производње ЕУ, 2,7 милиона тона), Шпанија (12,6%, 1,6 милиона тона), Немачка (11,9%, 1,5 милиона тона), Француска (11,6%, 1,5 милиона тона) и Италија (9,3%, 1,2 милиона тона). Супротно општем тренду, производња живинског меса у Пољској значајно је повећана (+7,5%) током 2022. године, достижући нови рекордни ниво, док је у Шпанији остала на релативно стабилном нивоу (+0,6%). Насупрот томе, значајно нижа производња забележена је у Француској (-8,7%) и Италији (-11,8%) (Eurostat, 2022).

Табела 6 SWOT анализа за сектор јаја

СНАГЕ	Количина и квалитет сточне хране
	Традиција и добро позната технологија производње
СЛАБОСТИ	Недовољна усклађеност са стандардима добробити животиња, хигијене и стандардима животне средине
	Старије становништво у руралним подручјима
	Уситњена производња и мале производне јединице

	Недостатак биосигурносних мера у екстензивној производњи
МОГУЋНОСТИ	Повећање тражње потрошача за производима из одрживе производње
	Повољни финансијски изгледи за одрживе производне системе
ПРЕТЊЕ	Појава епизоотских болести
	Недовољни капацитети за достизање стандарда у области добробити животиња

Производња јаја у Републици Србији у 2023. години је на нивоу нешто вишем од 1,5 милијарди комада, што представља минимални ниво производње јаја, забележен у претходних десет година (наведена производња у 2018. години износила је 1,79 милијарди). Овакав тренд је очекиван, имајући у виду смањење укупног броја кока носиља у 2023. години. Њихов број у претходној деценији доста осцилује, уз благу тенденцију пада, која је присутна и током 2023. године, с обзиром на то да се бележи 2,6% мањи број кока носиља у односу на претходну годину, односно 9,5% испод петогодишњег просека. Кретање броја кока носиља имало је утицај и на број снесених јаја, који је у 2023. години 7% нижи у односу на претходну годину, док је у односу на петогодишњи просек тај број нижи за 12% (МПШВ РС, 2023). Поредићи податке о броју кока носиља и броја газдинстава која се баве њиховим узгојем у попису пољопривреде 2012 и 2023 (РЗС, 2012; РЗС, 2023) и Анкете о структури пољопривредних газдинстава 2018. године (РЗС, 2018), уочава се благо повећање броја кока носиља према Анкети у односу на попис из 2012. године, уз достизање броја од девет милиона грла, као и непромењен просечан број јединки по газдинству (30 грла по газдинству) у оба истраживања. Међутим, према резултатима пописа из 2023. године, просечан број грла по газдинству је повећан на 42, што говори у прилог укрупњавању газдинстава. Ипак, иако је дошло до укрупњавања производње, број кока носиља је према попису из 2023. године мањи у односу на резултате пописа из 2012. године за 12%, док је број газдинстава у истом периоду смањен за 36%.

На основу наведених података може се рећи да пољопривредни сектор Републике Србије поседује значајне ресурсе, како у смислу обима тако и њихове разноврсности, што пружа значајне могућности раста производње, диверзификације производа и услуга и креирања нових, иновативних производа и пракси. Са друге стране, неопходни су озбиљни напори у структурно реформисање сектора пољопривреде и руралних средина, у смислу јачања њихове економске ефикасности и конкурентности. Већина објеката за узгој и тов животиња у Републици Србији мора бити реконструисана или прилагођена, како би се достигли неопходни захтеви за узгој и добробит животиња, као и стандарди у области заштите животне средине, имајући у виду посебну важност која се придаје унапређењу биосигурности на газдинству, управљању стајњаком и

коришћењу обновљивих извора енергије. Неопходна је модернизација производне инфраструктуре у циљу достизања боље одрживости и конкурентности на тржишту, док сама производња мора бити економичнија и ефикаснија.

Будућност сточарства, које је интезивно у погледу радне снаге и запошљава највећи број становништва у руралним подручјима, није само питање развоја пољопривреде, већ је и повезано са политиком руралног развоја. Подршка у оквиру пољопривредне политике и политике руралног развоја дефинисана је Законом о подстицајима у пољопривреди и руралном развоју (Пропис, 2013), којим се, поред врста подстицаја, прописују услови, начини коришћења и корисници подстицаја у пољопривреди и руралном развоју. На основу овог закона доноси се уредба о расподели подстицаја у пољопривреди и руралном развоју за сваку календарску годину, којом се врши алокација буџетских средстава, прописана законом о буџету Републике Србије за календарску годину. Подстицаји у пољопривреди и руралном развоју се финансирају из буџета Републике Србије, при чему су поједине мере подршке финансиране из ЕУ фондова и међународних донаторских средстава. Током 2023. године, у оквиру националне пољопривредне политике и политике руралног развоја, реализовани су следећи подстицаји:

1. Директна плаћања (премије, подстицаји за производњу, регреси), која кроз подстицаје за родитељске кокошке лаког типа износе 100 РСД/грлу, а за родитељске ћурке 3.300 РСД/грлу. Увођењем ове шеме подршке, произвођачима се шаље јасан сигнал да је неопходно да раде на очувању бројног стања грла, као и на унапређењу расне структуре стада и производних карактеристика сопствених грла. Ефекат примене подстицаја за приплодна грла манифестоваће се кроз унапређење квалитета производа сточарства, као и кроз повећање количина производа пласираних на тржиште. Такође, реализацијом ове мере повећава се конкурентност произвођача, с обзиром да се утиче на смањење цена коштања.
2. Мере руралног развоја,
3. Посебни подстицаји,
4. IPARD подстицаји,
5. Кредитна подршка у пољопривреди.

Јасно разграничење између корисника IPARD подршке и националних мера подршке руралном развоју (NPRR) представљено је у Табели 7.

Табела 7 Разграничење између корисника IPARD подршке и националних мера подршке руралном развоју (Пропис, 2023)

ИНВЕСТИЦИЈЕ У ФИЗИЧКУ ИМОВИНУ ПОЉОПРИВРЕДНИХ ГАЗДИНСТАВА		
Сектор	IPARD	NPRR
	Пољопривредна газдинства која на крају инвестиције имају капацитет од минимум минимум 1.000 и максимум 10.000 ћурки, и/или минимум 300 и максимум 3.000 гусака, и/или минимум 5.000 и максимум 50.000 бројлера по турнусу, и/или уписаним објектом за производњу родитељског јата кокошки тешког типа, на крају инвестиције. Пољопривредна газдинства са капацитетом објекта већим од 10.000 ћурки и/или већим од 3.000 гусака, и/или већим од 50.000 бројлера по турнусу, на почетку инвестиције, прихватљива су за инвестиције у изградњу и/или реконструкцију складишних капацитета за стајњак и/или у специфичну опрему и механизацију за објекте за манипулацију стајњака, као и за инвестиције у производњу енергије из обновљивих извора на пољопривредном газдинству и инвестиције у побољшање биосигурносних мера.	
Сектор меса		Пољопривредна газдинства која на крају инвестиције имају укупан капацитет од максимум 999 ћурки и/или 299 гусака и/или 4.999 бројлера по турнусу
Сектор јаја	Пољопривредна газдинства са укупним капацитетом објекта од минимум 5.000 до максимум 200.000 кока носиља у експлоатацији, односно пољопривредна газдинства која имају уписан објекат за производњу родитељског јата кокошки лаког типа, односно одгој кока носиља, на крају инвестиције; Пољопривредна газдинства са капацитетом објекта већим од 200.000 кока носиља, на почетку инвестиције су прихватљива за инвестиције у	Пољопривредна газдинства са укупним капацитетом објекта до 4.999 кока носиља у експлоатацији

	реконструкцију објекта у вези са заменом старих необогаћених кавеза и/или опреме ради испуњења стандарда ЕУ, као и за инвестиције у производњу енергије из обновљивих извора на пољопривредном газдинству.	
ИНВЕСТИЦИЈЕ У ФИЗИЧКУ ИМОВИНУ КОЈЕ СЕ ТИЧУ ПЕРЕРАДЕ И МАРКЕТИНГА ПОЉОПРИВРЕДНИХ ПРОИЗВОДА		
Сектор перераде меса и маркетинг	• Корисници који су уписани у Регистар објеката (Пропис, 2005) на крају инвестиције • У случају кланица, прихватљиви су корисници са минималним капацитетом клања од 500 ћурки и гусака или 5.000 јединки живине дневно на крају инвестиције • У случају постројења за сечење и/или прераду меса, прихватљиви су корисници са минималним капацитетом сечења или прераде од 500 кг прераде дневно на крају инвестиције	Корисници који су уписани у Регистар објеката (Пропис, 2005) • У случају кланица, прихватљиви су корисници са максималним капацитетом клања до 499 ћурки и гусака или 4.999 јединки живине дневно на крају инвестиције • У случају постројења за сечење и/или прераду меса, прихватљиви су корисници са максималним капацитетом сечења или прераде
Сектор прераде јаја и маркетинг	Микро, мала и средња правна лица, у складу са ЕУ препоруком о малим и средњим предузећима (МСП), прихватљива су на крају инвестиције	Подршка корисницима за инвестиције у вези са прерадом и маркетингом јаја ће се спроводити само кроз IPARD програм.

Општи је закључак да су мере подршке за мања газдинстава планирана кроз Национални програм руралног развоја, а за мања и средња газдинства кроз IPARD програм (Инструмент за претприступну помоћ за рурални развој). При томе, подршка малим газдинствима усмерена је на повећање дохотка и економску самоодрживост, док је подршка за газдинства средње величине базирана на унапређењу ефикасности и конкурентности.

Системске мере у живинарству

Стратегија пољопривреде и руралног развоја Републике Србије за период 2014-2024. година (Пропис, 2014) представља стратешки документ највишег нивоа општости, којим се дефинишу визија, циљеви, приоритетне области деловања, као и правци развоја пољопривреде и руралног развоја Републике Србије у претходном десетогодишњем периоду. Како се важење и примена овог документа завршавају крајем 2024. године, започета је и у току је израда стратешког

документа за наредни период. Национални програми за пољопривреду и рурални развој се доносе на основу стратегије (Пропис, 2014), као средњерочни програмски документи, који покривају трогодишњи период и садрже планове и динамику реализације мера. Поред тога, национални програми садрже активности и мере, које се у примењују у циљу даљег усклађивања националне пољопривредне политике са Заједничком пољопривредном политиком ЕУ (ЗПП). Претходни национални програм за пољопривреду примењивао се у трогодишњем периоду од 2018. до 2020. године (Пропис, 2017). Наредни национални програм за пољопривреду требало је да се реализује почев од 2021. године, али због ванредних околности, изазваних пандемијом COVID-19, израда документа започела је током 2021. године, са роком примене документа почев од 2022. године, у наредном трогодишњем периоду (Пропис, 2022). Национални програм за пољопривреду за период 2022-2024. године (Пропис, 2022) базиран је на Стратегији пољопривреде и руралног развоја Републике Србије за период 2014-2024. године (Пропис, 2014) и представља њену даљу разраду на средњорочном (трогодишњем) нивоу. Посебно поглавље у овом програму односи се на стандардизацију робе у домаћој и међународној трговини, која обезбеђује јасно дефинисан квалитет, изражен кроз тржишне стандарде. Примена тржишних стандарда омогућава лакшу комуникацију међу учесницима на тржишту, као и олакшан тржишни пласман. Успостављањем тржишних стандарда, купац је сигуран да купује робу тачно класификованог квалитета, док би продавац требало да има исти третман као сви продавци исте категорије производа. Већина прописа, који регулишу тржишне стандарде и квалитет пољопривредних и прехрамбених производа, а који се тренутно примењују у Републици Србији, није усклађена са међународним прописима и стандардима, што углавном отежава пласман српских производа на инострано тржиште. Усаглашавање домаћих прописа у овој области са међународним прописима и стандардима умногоме ће допринети не само повећању извоза, већ и регулисању ситуације на домаћем тржишту.

Један од предуслова даљег развоја сектора јаја јесте израда законског оквира, којим би се уредио систем класирања јаја и извештавање о њиховим ценама. Тренутно важећи пропис делимично је усклађен са ЗПП у овој области, а да би се достигла пуна хармонизација прописа са правним тековинама ЕУ, потребно је успоставити транспарентан систем извештавања о ценама јаја. Реализацијом ових активности створиће се услови за унапређење положаја српских произвођача на домаћем и међународном тржишту. Тржишни стандарди за живинско месо такође нису усклађени са ЗПП, због чега је национално законодавство потребно ускладити са правилима ЕУ у овој области, нарочито у делу који се односи на класирање живинског меса и извештавање о ценама.

Резултати увођења нових мера у живинарској производњи током периода примене Програма прате се кроз два показатеља: учешће извоза живинског меса у укупном извозу и учешће извоза јаја у укупном извозу. У том смислу, крајем

периода примене програма очекује се повећано учешће извоза живинског меса за 0,05%, док би учешће извоза јаја у укупном извозу требало да се повећа за 0,02% у 2024. години. Како би се наведени циљеви реализовали неопходно је:

- доношење правилника о тржишним стандардима за месо пернате живине и
- доношење правилника о тржишним стандардима за јаја и јаја за лежење и пилиће домаће живине.

Показатељи резултата за тржишне стандарде приказани су у Табели 8.

Табела 8 Показатељи резултата за тржишне стандарде (Пропис, 2014)

Индикатор	Јединица мере	Базна вредност (2020.)	Циљна вредност (2024.)
Учешће извоза свежег воћа и поврћа у укупном извозу	%	7,0	10,0
Учешће извоза живинског меса у укупном извозу	%	0,25	0,30
Учешће извоза јаја у укупном извозу	%	0,08	0,10

Слично наведеном Програму, IPARD III програм Републике Србије за период 2021-2027. године (Пропис, 2023) дефинисао је специфичне циљеве за различите видове производње, који се конкретно у живинарству могу поделити на сектор производње меса и јаја, као и сектор прераде меса и јаја и маркетинг.

1. Сектор месо:

- Унапређење стандарда заштите животне средине, производне инфраструктуре и опреме, у циљу достизања одрживости и конкурентности на тржишту ЕУ.
- Повећање вредности пољопривредне производње додавањем вредности примарним производима кроз подршку виших фаза прераде на газдинствима.
- Повећање подршке већим специјализованим газдинствима за инвестиције у вези са биолошком безбедношћу ЕУ, добробити животиња, управљањем и складиштењем стајњака и/или отпада и/или стандардима за складиштење и управљање отпадним водама.
- Побољшање хоризонталног повезивања пољопривредних произвођача.

2. Сектор прераде меса и маркетинг:

- Унапређење објеката за клање, сечење и прераду меса, како би се ускладили са стандардима ЕУ.

- Увођење нових технологија, побољшање процеса производње и побољшање производа, у циљу бољег позиционирања на домаћем и међународном тржишту.
 - Увођење система безбедности и квалитета хране (GHP – добра хигијенска пракса, GMP – добра произвођачка пракса, HACCP – анализа опасности и критичних контролних тачака и ISO – међународна организација за стандардизацију), ради праћења, контроле и управљања производњом.
 - Унапређење управљања отпадом и отпадним водама, као и обновљивим изворима енергије.
3. Сектор јаја:
- Унапређење конкурентности и продуктивности пољопривредних газдинстава која се баве производњом јаја кроз улагања у изградњу објеката и набавку опреме.
 - Достижање стандарда ЕУ у погледу безбедности и квалитета јаја, добробити животиња и заштите животне средине, кроз улагања у изградњу објеката и набавку опреме за држање (узгој) кокошака носила, складиштење и управљање стајњаком, као и производњу енергије из обновљивих извора на пољопривредном газдинству.
4. Сектор прераде јаја и маркетинг:
- Унапређење нових и постојећих прерађивачких капацитета, како би се ускладили са стандардима ЕУ, као и повећање конкурентности и продуктивности.
 - Увођење нових технологија и побољшање процеса производње и производа, у циљу бољег позиционирања на домаћем и међународном тржишту.
 - Увођење система безбедности и квалитета хране (GHP, GMP, HACCP и ISO).
 - Побољшање третирања и управљања отпадом.

ЗАКЉУЧАК

Из свега претходно наведеног произилази да ће будући развој живинарства код нас и у свету имати успеха само уколико се строго води рачуна о квалитету исхране и здрављу људи, имајући при томе у виду економичност производње, добробит животиња и очување животне средине уз уважавање мишљења науке и струке. То налаже мултидисциплинарни сарадњу и свеобухватни приступ који се може свести на следеће мере:

1. Боља контрола увоза јаја и хибрида, уз максимално ангажовање санитарних и селекцијских служби.
 2. Чешћа контрола и гарантовање квалитета како хране за живину, тако и здравственог стања и свих предузетих превентивних мера у производњи једнодневне пилаци намењених за тов или производњу носила јаја за конзум, чиме се избегавају не ретки судски спорови.
-

3. Строжија контрола свих увозних компоненти за исхрану живине.
 4. Свакодневно праћење најважнијих зоохигијенских параметара, као и чешћа контрола квалитета воде за пиће на фармама.
 5. Веће субвенционисање у овој врсти производње, као и унапред уговорене цене крајњих производа (меса и јаја).
 6. Успостављање партнерског односа, повезаности и добре сарадње између произвођача хране за живину, фармера и представника кланичне индустрије, који треба заједнички да деле остварени профит. То уједно налаже и формирање удружења у циљу заједничког наступа на тржишту.
 7. Изградња кланица по свим европским стандардима, које би опслуживале већи број мањих произвођача, што је неопходан предуслов за повећање контроле квалитета и извоза.
 8. Оспособљавање већег броја стручних лица у оквиру већ постојећих служби, који би радили на терену у циљу контроле производње и решавања тренутних проблема у живинарству, као и едуковања произвођача (стручна предавања и семинари).
 9. Формирање што већег броја породичних фарми, уз коришћење постојећих капацитета, како би се, поред повећања запослености и подмирења домаћег тржишта, стекли услови за већи извоз живинског меса и јаја, посебног квалитета. Наведени произвођачи имају могућност удруживања у задруге како би кроз заједничку сарадњу и наступ на тржишту били што видљивији и конкурентнији.
 10. Максимално коришћење домаћих компоненти намењених за производњу хране за живину, уз праћење њиховог квалитета и исправности, правилног складиштења и превенирања развоја плесни и микотоксина.
 11. Посебну пажњу треба посветити структури и квалитету оброка, јер се на тај начин значајно може утицати на квалитет добијеног производа и здравље људи, при чему оброк увек мора имати и прихватљиву цену.
 12. Успостављање стационарних огледних пунктова (посебно при факултетима и институтима), у којима би се вршила експериментална истраживања, коришћењем најновијих биотехнолошких достигнућа у овој области, а чији би позитивни ефекти затим могли бити примењени у пракси.
 13. У свом професионалном раду и каријери, агрономи и ветеринари не би требало да буду конкуренти, већ напротив, колеге са јасно дефинисаним пољем рада. Они никако не смеју да забораве и прекину контакт и сарадњу са факултетима са којих су потекли. Њихова кровна институција требало би да увек представља ослонац у практичном раду, пружи им могућност додатног усавршавања, али и поуздане лабораторијске услуге које ће са сигурношћу користити.
 14. Неопходно је ангажовати струку приликом доношења свих законских прописа који регулишу ову област. При томе је потребно дати знатно више
-

медијског простора еминентним домаћим стручњацима, који и те како имају шта да кажу.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Уговор број 451-03-136/2025-03/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Eurostat (2022): Poultry statistics – Production of eggs for consumption, EU, 2013-2021. Eurostat, EU.
- Ghimpețeanu O. A., Militaru M., Louise Scippo M. (2014): Dioxins and polychlorinated biphenyls contamination in poultry liver related to food safety – A review. *Food Control*, 38:47-53.
- Јокић Ж., Ковчин С., Јоксимовић-Тодоровић М. (2004): Исхрана живине. Пољопривредни факултет Земун.
- Јокић Ж., Радуловић С., Шефер Д. (2023): Исхрана живине. Пољопривредни факултет Земун.
- Kleyn F. J., Ciacciariello M. (2021): Future demands of the poultry industry: will we meet our commitments sustainably in developed and developing economies? *World's Poultry Sci J*, 77(2):267-78.
- Lam W. K., Zhong N. S., Tan W.C. (2003): Overview on SARS in Asia and the World. *Respirology*, 8:S2-S5.
- Марковић Р., Балтић М. (2018): Исхраном животиња до функционалне хране. Факултет ветеринарске медицине, Научна КМД.
- МПШВ РС (2023): Извештај о стању у пољопривреди у Републици Србији у 2023. години, (Зелена књига 2023.). Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије.
- Пропис (2005): Закон о ветеринарству. Службени гласник Републике Србије, 91/05, 30/10, 93/12, 17/19.
- Пропис (2013): Закон о подстицајима у пољопривреди и руралном развоју. Службени гласник Републике Србије, 10/2013, 142/2014, 103/2015, 101/2016, 35/2023, 92/2023.
- Пропис (2014): Стратегија пољопривреде и руралног развоја Републике Србије за период 2014-2024. Године. Службени гласник Републике Србије, 85/2014.
- Пропис (2017): Национални програм за пољопривреду Републике Србије за период 2018. до 2020. године. Службени гласник Републике Србије, 85/2017.
- Пропис (2022): Национални програм за пољопривреду за период 2022-2024. године. Службени гласник Републике Србије, 85/2022.
-

- Пропис (2023): Закључак о усвајању IPARD III програма за Републику Србију за период 2021-2027. Године. Службени гласник Републике Србије, 118/2023.
- Радуловић С., Јокић Ж., Шефер Д., Марковић Р., Перић Д., Стевановић Ј., Михаиловић Н. (2024): Погледи на проблеме у живинарској производњи и правци будућег развоја. *Живинарство*, 58(8-9):44-56.
- Радуловић С., Марковић Р., Петрујкић Б., Шефер Д. (2018): Оптимизација obroка употребом софтвера. 39. семинар за иновације знања ветеринара, Зборник предавања, 159-167.
- РЗС (2012): Попис пољопривреде из 2012. године. Републички завод за статистику Републике Србије.
- РЗС (2018): Попис пољопривреде из 2018. године. Републички завод за статистику Републике Србије.
- РЗС (2020): Статистички годишњак 2020. Републички завод за статистику Републике Србије.
- РЗС (2023): Попис пољопривреде из 2023. године. Републички завод за статистику Републике Србије.
- Scanes C. (2007): The global importance of poultry. *Poult. Sci*, 86:1057.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401147R

UDK 631.147:636.5]:338.3(497.11)

Original Scientific Paper

POULTRY PRODUCTION IN THE REPUBLIC OF SERBIA - CURRENT SITUATION AND PERSPECTIVES

Stamen RADULOVIĆ^{1*}, Dragan ŠEFER¹, Radmila MARKOVIĆ¹, Dejan PERIĆ¹, Jasna STEVANOVIĆ², Bojan STOJANOVIĆ³, Aleksandra IVETIĆ⁴, Drago NEDIĆ¹

¹ University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

² Chamber of Commerce and Industry of Serbia, Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

⁴ Institute for Science Application in Agriculture, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Stamen Radulović, stamenradulovic@gmail.com

Summary

Over the last decades, poultry production has grown from a secondary activity in rural households into a highly specialized industrial branch of livestock production that has great potential for the development of the economy of many countries. A total of 21.6 million poultry are currently raised in the Republic of Serbia, of which 12.5 million are broilers and 7.5 million are laying hens. In comparison with the results of the Census of Agriculture 2018, there is a noticeable decrease in the total number of poultry by 7.3%, i.e. by as much as 23.25% compared to the results from 2012. Egg production is at the level of slightly more than 1.5 billion pieces, which represents the minimum recorded level of egg production during the previous ten years. On the other hand, during 2023, the production of poultry meat was 127,000 t, i.e. at a 10% higher level compared to the previous year and 13.6% more compared to the five-year average. Serious efforts are necessary in the structural reform of this sector of agriculture, but also of rural areas, in terms of strengthening their economic efficiency and competitiveness.

Key words: poultry production, nutrition, broilers, layers.

INTRODUCTION

Thanks to the biological characteristics of poultry (high reproductive capacity, rapid growth, short generation interval and efficient use of food), the development of poultry production in the world, as well as in our country, has been intensified in recent decades. This applies mostly to chickens, which represent the basis of modern industrial production, but also to turkeys, which are represented in much smaller numbers. New and improved old hybrids of high genetic potential were created, which resulted in a significant shortening of the duration of fattening, faster sexual maturation

of individuals, shorter laying time and a longer period of exploitation. However, it should be noted that this type of selection has led to some problems. This primarily refers to their reduced resistance, higher incidence of metabolic disorders, greater requirements regarding care and conditions, high nutrient requirements and the necessity of using nutrients of good biological value and digestibility (Kleyn et al., 2021). Regardless of all the challenges it faces, during the last decades, poultry production has grown from a secondary activity in rural households into a highly specialized industrial branch of livestock production, which enables the production of significant quantities of high-quality products such as meat and eggs in a relatively short period of time, but also feathers, organic fertilizer and accompanying products that remain after slaughtering and processing carcasses. Because of this, as well as the rapid turnover of capital it provides, it has great potential for the development of the economy of many countries. The dietary properties of meat and the high nutritional value of eggs, as well as their relatively low market price, make these products acceptable by all cultures and nations, and at the same time very desirable and suitable foods in people's daily diet (Marković and Baltić, 2018).

Current situation in poultry production

Based on the results of the 2023 agriculture census (RZS, 2023), a total of 21.6 million poultry (21,604,693) are raised in the Republic of Serbia, of which 12.5 million are broilers (12,468,831) and 7.5 million are laying hens (7,489,642). Compared to the year 2022, the total number of poultry is 3.6% lower, with the number of laying hens reduced by 5.2%. However, this negative trend is much more pronounced if the results of the agricultural census conducted in 2012 and 2018 are analyzed (RZS, 2012; RZS, 2018). Thus, in 2018, the total number of poultry was 23,184,408, with a decrease of 7.3%, i.e. by as much as 23.25% when it comes to 2012 (the total number of poultry then was 26,627,308).

In relation to regions of the Republic of Serbia, poultry is grown the most in Vojvodina region, with a total of 9,676,620 individuals, (which represents 45% of the total number), followed by Šumadija and Western Serbia, Southern and Eastern Serbia and the Belgrade region.

The structure of farmed poultry according to species indicates that chickens are dominantly represented with 98% (broilers 58%, and laying hens 35%), while the participation of ducks, turkeys and geese is 0.5%, 0.4% and 0.3%, respectively. Compared to the five-year average, there is an evident decline in the number of turkeys (-25%) and ducks (-14%), while the number of geese is on the rise (+43%), thanks primarily to the large increase in the number of geese in 2023 compared to 2022, by as many as 35 thousand units (+150%).

Poultry owners are almost entirely registered as family farms (220,324), with a very small number of legal entities (147) and entrepreneurs (44). It is interesting that legal entities have more than 8.5 million poultry (8,553,613), that is, approximately 40% of the total number of poultry. Likewise, the consolidation of farms engaged in poultry

production is also evident. Namely, five years ago the number of farms with up to 50 animals was 23% of the total number of farms (RZS, 2018), while now this is at the level of 16%. At the same time, the representation of farms with over 5,000 units increased from 58% to 71.5%. The presented results support the fact that poultry production takes an industrial character and requires a corporate approach. It is estimated that the total industrial production of animal feed in our country on an annual basis amounts to slightly over 1.4 million tons, of which poultry feed takes a share of 33%. Table 1 presents data of the production of complete, supplemental and premixes for poultry feed in the last four years (RZS, 2023).

Table 1 Industrial production of poultry feed in the Republic of Serbia

Industrial production of poultry feed (in tons)	Realized production/year			
	2021	2022	2023	2024*
Complete mixes	441.463	456.217	489.734	308.473
Supplemental mixes	7.911	6.862	8.220	5.371
Premixes	2.223	1.963	1.207	737

* January-July

Economic indicators of production

Of the total value of agricultural production in the Republic of Serbia in 2019, animal husbandry comprised about 29%, with a value of EUR 1.49 billion, which represents 15% more compared to 2015. The value of livestock production observed by type of animal was as follows: cattle production was EUR 275.5 million, pigs EUR 540.4 million, poultry EUR 127.9 million, and sheep and goats EUR 90.2 million (RZS, 2020). According to data from the Economic Accounts for Agriculture in the Republic of Serbia, in the period from 2012 to 2022, in the structure of the value of livestock production, the average share of livestock breeding is 68.2%, and livestock products are 31.8%. In the breeding of livestock, in the observed period, the largest share is the breeding of pigs (51.8%), followed by the breeding of cattle (27.0%), poultry (12.4%), sheep and goats (8.6%) and horse breeding (0.2%).

The two main lines of production in animal husbandry relate to the breeding of broilers and the production of table eggs are the most represented branches of animal husbandry on farms in the Republic of Serbia. Out of ten farms of all types, almost seven raise poultry. At the same time, poultry farming is the most industrialized branch of agriculture, where as much as 37.3% of poultry heads are raised on only 225 farms that have the status of legal entities and entrepreneurs. In terms of production value, poultry farming ranks third in livestock farming with a share of 12%. According to the official data of the Statistical Yearbook of the Republic of Serbia for 2020, the production of chicken eggs and broilers accounted for 4.9% of the total value of agricultural production in 2019. It is obvious that the importance of poultry farming is growing both on the world market and on the market of the Republic of Serbia (Scanes, 2007).

Compared to 2022, the price of broilers in 2023 is 7% lower, while it is 19.7% higher compared to the five-year average price (Table 2). The prices of animal feed and energy, which have increased significantly in 2022, as well as the prices of poultry meat products, which are largely imported, have a great influence on this. At the same time, increased slaughtering and a greater supply of meat caused a lower price of meat on the market.

Table 2 shows the average annual purchase prices of poultry producers for the period 2014-2023 (RZS, 2023).

Table 2 Average annual purchase prices of poultry producers for the period 2014-2023

Year	Purchase prices in RSD/kg	Purchase prices in EUR/kg
2014	121.27	1.03
2015	112.91	0.94
2016	111.98	0.91
2017	111.76	0.92
2018	104.71	0.89
2019	95.57	0.81
2020	96.53	0.82
2021	112.88	0.96
2022	141.74	1.21
2023	132.00	1.13
Index 2023/22	93.13	93.29
Index 2023/18-22	119.69	120.17

In the foreign trade exchange of poultry meat, a multi-year deficit has been recorded in the past period, with a growing trend present. The value of poultry meat exports in 2023 is 5.7% higher than the previous year, which is 20% above the level of the average five-year export value. During 2023, the value of imported poultry meat was 12% higher than the previous year, i.e. even 61% higher than the average five-year import value of this type of product. Table 3 shows data on foreign trade of poultry meat in the period from 2019 to 2023 (RZS, 2023).

Table 3 Foreign trade exchange of poultry meat (carcass weight equivalent) (000 EUR)

Year	2019	2020	2021	2022	2023
Export	16.827	16.425	17.549	19.832	20.978
Import	35.348	37.655	43.821	59.925	67.164
Balance	-18.521	-21.230	-26.272	-40.093	-46.186

During 2023, the price of eggs increased by 13% compared to the previous year, reaching a level even 52% higher than the average five-year price (Table 4). The prices of animal feed and energy had a significant impact on the price of eggs, which were significantly increased during 2022 and 2023, with simultaneous inflationary pressure. Eggs from the Republic of Serbia are exported exclusively to Bosnia and Herzegovina, Montenegro and North Macedonia, while egg products are imported in large quantities from member states of the European Union (EU), despite the fact that there are two approved facilities for egg processing in the Republic of Serbia ("Takovo" from Indija and "Melange" from Valjevo). Table 4 shows the average annual purchase prices of table egg producers for the period 2014-2023 (RZS, 2023).

Table 4 Average annual purchase prices of table egg producers for the period 2014-2023

Year	Prices in RSD/piece	Prices in EUR/piece
2014	8.24	0.07
2015	7.79	0.06
2016	7.69	0.06
2017	8.55	0.07
2018	7.70	0.07
2019	8.04	0.07
2020	7.99	0.07
2021	8.22	0.07
2022	11.80	0.10
2023	13.38	0.11
Index 2023/22	113.39	113.59
Index 2023/18-22	152.91	153.52

The most important problems burdening poultry production

Given that the acquisition of quality breeding or fattening material is a basic step in poultry production, first of all, it should be mentioned the fact that unfortunately not a single hybrid has been created in our country to date, but production is based only on the import of breeding heads and eggs from European countries. They are procured through private companies that are mainly focus on profit, while the quality and the problems of farmers are neglected. Imported eggs are sometimes out of class, so after their incubation and breeding young, a parental flock is formed, which during the production cycle constantly has bad production results (Jokić et al., 2004). Farmers who fatten broilers and turkeys or produce table eggs are in similar situation (as producers of parent flocks). Namely, due to the unstable market, the supply of one-day-old chicks (for fattening or future litters) varies a lot during the year, and therefore

their price. Unfortunately, we still have the old habit of abandoning production if one more dinar cannot be earned on the invested dinar.

Due to the irregularity of the market, the prices of meat, eggs and poultry feed vary significantly over a year. It often happens that the price of food does not follow the price of meat and eggs and vice versa. Also, the price of meat on the market is not adjusted when the price of fattened chicken on the farm changes (increases or decreases). It is often the case that imported chicken (characterized by our housewives as "bloated, full of water") is sold at a lower price than domestically produced, high-quality chicken, as well as that fatty and lean carcasses or small and large eggs have the same price on the market (Jokić et al., 2023). To the greatest extent, this disrupts possible good cooperation between animal feed producers, farmers and the processing industry. At the end of the production cycle (fattening or production of consumption eggs), another big problem arises, how to bring the fattened heads or consumption eggs on the market and at what price. This is left to the producers themselves, who are technically unequipped and without an organized performance. Unfortunately, they often have to sell their products at a low price, because with each further extension of production, they enter into an even greater financial problem.

It should also be emphasized that farmers (mostly small individual producers) bear a large part of the responsibility, because, whether due to ignorance, negligence, or simply ignoring the instructions for the use of veterinary drugs, they use them during the laying period, or until the end of fattening, which results in the appearance of residues in meat and eggs. Although our country has a very good program for controlling the above substances, without raising the awareness of the producers themselves about the importance of the correct use of drugs, this problem can never be completely solved. We must not forget the fact that we are among the leading countries in Europe in terms of the number of carcinogenic diseases (Jokić et al., 2004). Due to similar failures, and in the race for profit, not so long ago, major failures occurred in the world (the case of carcinogenic dioxin in Europe and SARS in Asia), when hundreds of millions of fattened chickens were mass-culled (Ghimpețeanu et al., 2014; Lam et al., 2003).

Due to increase market competition, producers are forced to try to solve the problems independently, without the help and advice of experts. Thus, poultry production today is mainly carried out by people who do not know this field sufficiently, and do not have agronomists and veterinarians engaged on their farms. Because of their lack of knowledge, they mostly adhere to established technologies, to which they are accustomed (because they are afraid of introducing innovations), and which have long been overcome and abandoned in production (Radulović et al., 2024).

Today, various programs for formulating meals are in use, which, in addition to the chemical composition and recommendations for a particular type and category of poultry, also take into account the price of the feed, as well as numerous other parameters such as electrolyte balance, buffering and antioxidant capacity of the feed. However, the acquisition of a quality program also requires the engagement of a

professional who will manage it. There are numerous examples in the field where farmers have independently, in order to achieve a lower price for the mixture, used cheaper feeds of poorer quality in a high percentage, and then achieved very poor production results. Likewise, they often accept the so-called field recipes that gave a good effect on a particular farm, without taking into account the differences that exist between the hybrids used, zoohygienic conditions or problems that are present in their facility. Errors can also occur among designers (programmers) themselves, who are unfamiliar with the field of animal nutrition, so their programs often do not have good usability, but instead require additional manual work by nutritionists (Radulović et al., 2018).

Food from foreign producers is often praised in the field, although all the prerequisites exist for food of the same, or even better quality, to be produced from domestic raw materials, given that in terms of competence we are not behind foreign experts. Likewise, there is a large number of imported additives on the market, and some of them are often attributed with unrealistic properties. If their effects have not been tested in the production conditions that are common in our country, then they generally represent only beautifully presented data on impeccably designed marketing material (flyer). Often, due to the "human factor", a larger number of additives with the same mode of action are unnecessarily used in one and the same mixture, which significantly increases its cost. It is important to note that additives should never be used as a substitute for inadequate housing conditions, incompetent nutritional management, mistakes made in hatchery facilities, and poor genetic potential of the flock.

Sectoral SWOT analysis

Based on the analysis of the situation by sector in agriculture and rural development, data and other inputs were obtained that enable the preparation of a SWOT analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats). In a summarized manner, the SWOT table systematizes knowledge about the strengths and opportunities for improving the situation in this agricultural sector and in the field of rural development, which warns of the weaknesses and threats that the agricultural sector and rural areas may encounter in the future (Tables 5 and 6). This information represents the basis for the systematization of the objectives, measures and activities of the Strategy and accompanying documents, and therefore serves as a guide for political decision-makers (Rulebook, 2014; Rulebook, 2023).

Table 5 SWOT analysis for the meat sector

STRENGTHS	Sufficient fodder production
	Satisfactory workforce numbers
	The existence of a large number of educational and scientific institutions
	Good regional representation of advisory services

WEAKNESSES	Low financial capacity of the sector
	Shredded production and small production units
	Insufficient education of producers and small meat processors
	Insufficient level of compliance with standards (animal welfare, food safety and environmental protection)
	Outdated technology, facilities, machines and equipment
	Poor farm management skills
	Lack of an efficient system for disposal of animal waste and biosecurity
	Insufficient use of renewable energy sources
	Lack of adequate advisory support and training
	Weak transfer of technology and low level of research and development
OPPORTUNITIES	Good strategic and financial environment at national and EU level
	Increased consumer demand for local products and short chain values
THREATS	Frequent occurrence of epizootic diseases
	Price change on the market

The number of poultry slaughtered over the last decade has averaged around 65 million heads, with the highest number of heads slaughtered in 2019. In 2023, this number is 7% higher than the previous year and amounts to 69.6 million heads. The number of slaughtered heads in 2023 is 1.5% higher than the five-year average. The average gross mass of slaughtered poultry in 2023 increased minimally, from 2.5 to 2.6 kg, while the net mass remained unchanged compared to 2022 (1.8 kg). Poultry meat production in the previous ten-year period ranged from 86 thousand tons to 115 thousand tons, in 2020 (with an average annual consumption of 17 kg per capita), up to a record level of 127 thousand tons, recorded in 2023. During 2023, poultry meat production was achieved at a 10% higher level compared to the previous year and 13.6% higher than the five-year average. The increase in poultry meat production is the result of an increase in poultry slaughtering, with a noticeable increase in the share of slaughtered heads in slaughterhouses in the total number of slaughtered poultry over the past decade – from 55% of slaughtered heads in slaughterhouses in 2013 to 99% of slaughtered heads in slaughterhouses in 2023 (MPŠV RS, 2023). These results support the fact that poultry meat is becoming a product that is slowly moving from small-scale production on farms to large industrial complexes. At the beginning of December 2019, the register of approved facilities of the Veterinary Directorate of the Republic of Serbia contained 78 approved facilities for slaughtering, cutting and processing white meat (poultry), as follows: 35 combined facilities for slaughtering, cutting and processing poultry; 21 facilities for slaughtering poultry; 22 facilities for slaughtering and cutting poultry (Rulebook, 2023).

In the EU, poultry meat production continued to decline in 2022, after reaching a record level in 2020. It is estimated that around 13 million tonnes of poultry meat were produced in the EU in 2022, which is 1.5% less than in 2021. This result represents an interruption of the significantly increasing trend of poultry meat production in the EU until 2020. In 2022, the largest poultry meat producers in the EU were Poland (21% of EU production, 2.7 million tonnes), Spain (12.6%, 1.6 million tonnes), Germany (11.9%, 1.5 million tonnes), France (11.6%, 1.5 million tonnes) and Italy (9.3%, 1.2 million tonnes). Contrary to the general trend, poultry meat production in Poland increased significantly (+7.5%) in 2022, reaching a new record level, while in Spain it remained relatively stable (+0.6%). In contrast, significantly lower production was recorded in France (-8.7%) and Italy (-11.8%) (Eurostat, 2022).

Table 6 SWOT analysis for the egg sector

STRENGTHS	Quantity and quality of fodder
	Tradition and well-known production technology
WEAKNESSES	Insufficient compliance with animal welfare, hygiene and environmental standards
	Older population in rural areas
	Shredded production and small production units
	Lack of bio safety measures in extensive production
OPPORTUNITIES	Increasing consumer demand for products from sustainable production
	Favorable financial prospects for sustainable production systems
THREATS	Occurrence of epizootic diseases
	Insufficient capacity to meet animal welfare standards

Egg production in the Republic of Serbia in 2023 is at the level of slightly more than 1.5 billion pieces, which represents the minimum level of egg production recorded in the previous ten years (the stated production in 2018 was 1.79 billion). This trend is expected, bearing in mind the decrease in the total number of laying hens in 2023. Their number fluctuated a lot in the previous decade, with a slight downward trend, which is also present during 2023, given that the number of laying hens is 2.6% lower than the previous year, i.e. 9.5% below the five-year average. The trend in the number of laying hens also had an impact on the number of eggs laid, which in 2023 was 7% lower compared to the previous year, while compared to the five-year average, this number was 12% lower (MPŠV RS, 2023). Comparing the data on the number of laying hens and the number of farms engaged in their breeding in the 2012 and 2023 Census of agriculture (RZS, 2012; RZS, 2023) and the Survey on the structure of agricultural holdings in 2018 (RZS, 2018), a slight increase in the number of laying hens can be noted according to the Survey compared to the 2012 Census, with the number reaching

nine million heads, as well as an unchanged average number of hens per farm (30 heads per farm) in both investigations. However, according to the results of the 2023 Census, the average number of heads per farm increased to 42, which speaks in favor of consolidation of farms. However, even though there was a consolidation of production, according to the 2023 Census, the number of laying hens is 12% lower than the results of the 2012 Census, while the number of farms decreased by 36% in the same period. Based on the above data, it can be said that the agricultural sector of the Republic of Serbia possesses significant resources, both in terms of volume and their diversity, which provides significant opportunities for production growth, diversification of products and services, and the creation of new, innovative products and practices. On the other hand, serious efforts are necessary to structurally reform the agricultural sector and rural areas, in terms of strengthening their economic efficiency and competitiveness. Most facilities for breeding and fattening animals in the Republic of Serbia must be reconstructed or adapted, in order to meet the necessary requirements for breeding and animal welfare, as well as standards in the field of environmental protection, bearing in mind the special importance attached to the improvement of biosecurity on farms, manure management and the use of renewable energy sources. It is necessary to modernize the production infrastructure in order to achieve better sustainability and competitiveness on the market, while the production itself must be more economical and efficient.

The future of animal husbandry, which is labor-intensive and employs the largest number of people in rural areas, is not only a question of agricultural development, but also related to rural development policy. Support within the framework of agricultural policy and rural development policy is defined by the Law on Incentives in Agriculture and Rural Development (Rulebook, 2013), which, in addition to the types of incentives, prescribes the conditions, methods of use and beneficiaries of incentives in agriculture and rural development. On the basis of this law, a regulation on the distribution of incentives in agriculture and rural development for each calendar year is adopted, which allocates budget funds, prescribed by the law on the budget of the Republic of Serbia for the calendar year. Incentives in agriculture and rural development are financed from the budget of the Republic of Serbia, while certain support measures are financed from EU funds and international donor funds. During 2023, within the framework of the national agricultural policy and rural development policy, the following incentives were implemented:

1. Direct payments (premiums, incentives for production, rebates), which through incentives for parent hens of light type amount to RSD 100/head, and for parent turkeys RSD 3,300/head. By introducing this support scheme, a signal is sent to the producers that it is necessary to work on preserving the number of the heads, as well as on improving the racial structure of the herd and the production characteristics of their own heads. The effect of the application of incentives for breeding cattle will be manifested through the improvement of the quality of livestock products, as well as through the increase in the quantity
-

of products placed on the market. Also, the implementation of this measure increases the competitiveness of producers, considering that it affects the reduction of cost prices.

2. Measures of rural development,
3. Special incentives,
4. IPARD incentives,
5. Credit support in agriculture.

A clear demarcation between beneficiaries of IPARD support and national rural development support measures (NPRR) is presented in Table 7.

Table 7 Demarcation between beneficiaries of IPARD support and national rural development support measures (Rulebook, 2023)

INVESTMENTS IN PHYSICAL ASSETS OF AGRICULTURAL FARMS		
Sector	IPARD	NPRR
Meat sector	Agricultural holdings that at the end of the investment have a capacity of minimum 1,000 and maximum 10,000 turkeys, and/or minimum 300 and maximum 3,000 geese, and/or minimum 5,000 and maximum 50,000 broilers per cycle, and/or a registered facility for the production of a parent flock of heavy-type chickens, at the end investments. • Agricultural farms with a building capacity of more than 10,000 turkeys and/or more than 3,000 geese, and/or more than 50,000 broilers per turn, at the beginning of the investment, are acceptable for investments in the construction and/or reconstruction of storage capacities for manure and/or in specific equipment and mechanization for manure manipulation facilities, as well as investments in the production of energy from renewable sources on the farm and investments in improving biosecurity measures.	Farms that at the end of the investment have a total capacity of a maximum of 999 turkeys and/or 299 geese and/or 4,999 broilers per turn
Egg sector	Farms with a total facility capacity of a minimum of 5,000 to a maximum of 200,000 laying hens in operation, i.e. agricultural farms that have a registered facility for the production of a parent	Agricultural farms with a total facility capacity of up to 4,999 laying hens in operation

	flock of light-type hens, i.e. raising of laying hens, at the end of the investment; • Agricultural farms with a facility capacity of more than 200,000 laying hens, at the beginning of the investment, are acceptable for investments in the reconstruction of the facility in connection with the replacement of old non-enriched cages and/or equipment in order to meet EU standards, as well as for investments in the production of energy from renewable sources on the agricultural economy.	
INVESTMENTS IN PHYSICAL ASSETS CONCERNING THE PROCESSING AND MARKETING OF AGRICULTURAL PRODUCTS		
Meat processing and marketing sector	• Users who are registered in the Register of Objects (Rulebook, 2005) at the end of the investment • In the case of slaughterhouses, users with a minimum slaughter capacity of 500 turkeys and geese or 5,000 poultry per day at the end of the investment are acceptable. • In the case of meat cutting and/or processing plants, users with a minimum cutting or processing capacity of 500 kg of processing per day at the end of the investment are acceptable.	Users registered in the Register of Objects (Rulebook, 2005) • In the case of slaughterhouses, users with a maximum slaughter capacity of up to 499 turkeys and geese or 4,999 poultry per day at the end of the investment are eligible. • In the case of meat cutting and/or processing plants, users with the maximum cutting or processing capacity are acceptable
Egg processing and marketing sector	Micro, small and medium-sized legal entities, in accordance with the EU recommendation on small and medium-sized enterprises (SME), are acceptable at the end of the investment	Support to users for investments related to egg processing and marketing will be implemented only through the IPARD program.

The general conclusion is that support measures for smaller farms are planned through the National Rural Development Program, and for smaller and medium-sized farms through the IPARD program (Instrument for Pre-accession Assistance for Rural Development). At the same time, support for small farms is aimed at increasing income and economic self-sustainability, while support for medium-sized farms is based on improving efficiency and competitiveness.

Systemic measures in poultry farming

Agriculture and rural development strategy of the Republic of Serbia for the period 2014-2024 (Rulebook, 2014) represents a strategic document of the highest level, which defines the vision, goals, priority areas of action, as well as directions for the development of agriculture and rural development of the Republic of Serbia in the previous ten-year period. Since the validity and application of this document ends at the end of 2024, the drafting of a strategic document for the next period has been started and is ongoing. National programs for agriculture and rural development are adopted on the basis of strategy (Rulebook, 2014), as medium-term program documents, which cover a three-year period and contain plans and dynamics of the implementation of measures. In addition, the national programs contain activities and measures, which are implemented with the aim of further harmonizing the national agricultural policy with the EU's Common Agricultural Policy (CAP). The previous national program for agriculture was implemented in the three-year period from 2018 to 2020 (Rulebook, 2017). The next national program for agriculture was supposed to be implemented starting in 2021, but due to extraordinary circumstances caused by the COVID-19 pandemic, the drafting of the document began in 2021, with the deadline for implementing the document starting in 2022, in the next three-year period (Rulebook, 2022). National program for agriculture for the period 2022-2024 (Rulebook, 2022) is based on the Agriculture and Rural Development Strategy of the Republic of Serbia for the period 2014-2024 (Rulebook, 2014) and represents its further development at the medium-term (three-year) level. A special chapter in this program refers to the standardization of goods in domestic and international trade, which ensures clearly defined quality, expressed through market standards. Application of market standards enables easier communication between market participants, as well as easier market placement. By establishing market standards, the buyer is sure that he is buying goods of exactly the classified quality, while the seller should have the same treatment as all sellers of the same product category. Most of the regulations, which regulate the market standards and quality of agricultural and food products, and which are currently applied in the Republic of Serbia, are not harmonized with international regulations and standards, which mainly hinders the placement of Serbian products on the foreign market. The harmonization of domestic regulations in this area with international regulations and standards will greatly contribute not only to the increase in exports, but also to the regulation of the situation on the domestic market.

One of the prerequisites for the further development of the egg sector is the creation of a legal framework, which would regulate the system of grading eggs and reporting on their prices. The currently valid regulation is partially harmonized with the CAP in this area, and in order to achieve full harmonization of regulations with the EU legal acquis, it is necessary to establish a transparent system of reporting on egg prices. The implementation of these activities will create conditions for improving the position of Serbian producers on the domestic and international markets. The market standards for poultry meat are also not harmonized with the CAP, which is why the national

legislation needs to be harmonized with the EU rules in this area, especially in the part related to poultry meat classification and price reporting.

The results of the introduction of new measures in poultry production during the Program implementation period are monitored through two indicators: the share of poultry meat exports in total exports and the share of egg exports in total exports. In this sense, at the end of the program implementation period, the share of poultry meat exports is expected to increase by 0.05%, while the share of egg exports in total exports should increase by 0.02% in 2024. In order to realize the stated goals, it is necessary to:

- adopt regulations of market standards for poultry meat and
- adopt regulations of market standards for eggs and laying eggs and chicks of domestic poultry.

The performance indicators for market standards are presented in Table 8.

Table 8 Indicators of results for market standards (Rulebook, 2014)

Indicator	Unit of measure	Base value (2020)	Target value (2024)
Share of export of fresh fruit and vegetables in total export	%	7.0	10.0
Share of poultry meat exports in total exports	%	0.25	0.30
Share of egg export in total export	%	0.08	0.10

Similar to the mentioned Program, the IPARD III program of the Republic of Serbia for the period 2021-2027 (Rulebook, 2023) defined specific goals for different types of production, which specifically in poultry can be divided into the meat and egg production sector, as well as the meat and egg processing and marketing sector.

1. Meat sector:

- Improvement of environmental protection standards, production infrastructure and equipment to achieve sustainability and competitiveness on the EU market.
- Increasing the value of agricultural production by adding value to primary products through the support of higher stages of processing on farms.
- Increasing support to larger specialized farms for investments related to EU biosecurity, animal welfare, management and storage of manure and/or waste and/or standards for waste water storage and management.
- Improvement of the horizontal connection of agricultural producers.

2. Meat processing sector and marketing:

- Improvement of facilities for slaughtering, cutting and processing meat to comply with EU standards.
- Introducing new technologies, improving production processes and improving products, with the aim of better positioning on the domestic and international markets.

- Introduction of food safety and quality systems (GHP – good hygienic practice, GMP – good manufacturing practice, HACCP – hazard analysis and critical control points and ISO – international organization for standardization), for monitoring, control and management of production.
- Improvement of waste and wastewater management, as well as renewable energy sources.
- 3. Egg sector:
 - Improving the competitiveness and productivity of agricultural farms engaged in egg production through investments in the construction of facilities and the purchase of equipment.
 - Achieving EU standards in terms of egg safety and quality, animal welfare and environmental protection, through investments in construction of facilities and procurement of equipment for keeping (breeding) laying hens, storage and management of manure, as well as production of energy from renewable sources on the farm.
- 4. Egg processing sector and marketing:
 - Improvement of new and existing processing capacities to comply with EU standards, as well as increasing competitiveness and productivity.
 - Introduction of new technologies and improvement of production processes and products, with the aim of better positioning on the domestic and international market.
 - Introduction of food safety and quality systems (GHP, GMP, HACCP and ISO).
 - Improvement of waste treatment and management.

CONCLUSION

From all of the above, it follows that the future development of poultry farming in our country and in the world will only be successful if the quality of nutrition and human health are strictly taken into account, keeping in mind the economy of production, the welfare of animals and the preservation of the environment, while respecting the opinions of science and the profession. This requires multidisciplinary cooperation and a comprehensive approach, which can be reduced to the following measures:

1. Better control of the import of eggs and hybrids, with maximum engagement of sanitary and selection services.
 2. More frequent control and guarantee of the quality of poultry feed, as well as the health status and all preventive measures taken in the production of one-day-old chicks intended for fattening or the production of laying eggs for consumption, which avoids not infrequent court cases.
 3. Stricter control of all imported poultry feed components.
 4. Daily monitoring of the most important animal hygiene parameters, as well as more frequent quality control of drinking water on farms.
 5. Greater subsidization in this type of production, as well as pre-agreed prices of final products (meat and eggs).
-

6. Establishing a partnership relationship, connection and good cooperation between producers of poultry feed, farmers and representatives of the slaughterhouse industry, who should jointly share the realized profit. This also requires the formation of an association with the aim of joint performance on the market.
7. Construction of slaughterhouses according to all European standards, which would serve a larger number of smaller producers, which is a necessary prerequisite for increasing quality control and exports.
8. Training of a larger number of experts within the already existing services, who would work in the field with the aim of controlling production and solving current problems in poultry farming, as well as educating producers (professional lectures and seminars).
9. The formation of as many family farms as possible, with the use of existing capacities, in order to, in addition to increasing employment and satisfying the domestic market, acquire the conditions for greater export of poultry meat and eggs, of special quality. The aforementioned producers have the option of joining cooperatives to be as visible and competitive as possible through joint cooperation and appearance on the market.
10. Maximum use of domestic components intended for the production of poultry feed, with monitoring of their quality and correctness, proper storage and prevention of mold and mycotoxin development.
11. Special attention should be paid to the structure and quality of the meal, because in this way the quality of the obtained product and the health of people can be significantly affected, while the meal must always have an acceptable price.
12. Establishment of stationary experimental points (especially at faculties and institutes), where experimental research would be carried out, using the latest biotechnological achievements in this field, and whose positive effects could then be applied in practice.
13. In their professional work and career, agronomists and veterinarians should not be competitors, but on the contrary, colleagues with a clearly defined field of work. They must never forget and stop contact and cooperation with the faculties from which they came. Their umbrella institution should always be a support in practical work, provide them with the possibility of additional training, but also reliable laboratory services that they will use with certainty.
14. It is necessary to engage the profession when adopting all legal regulations that regulate this area. At the same time, it is necessary to give significantly more media space to eminent domestic experts, who also have something to say.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (contract No. 451-03-136/2025-03/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Eurostat (2022): Poultry statistics – Production of eggs for consumption, EU, 2013-2021. Eurostat, EU.
- Ghimpețeanu O. A., Militaru M., Louise Scippo M. (2014): Dioxins and polychlorinated biphenyls contamination in poultry liver related to food safety – A review. *Food Control*, 38:47-53.
- Jokić Ž., Kovčin S., Joksimović-Todorović M. (2004): Poultry nutrition. Faculty of Agriculture Zemun.
- Jokić Ž., Radulović S., Šefer D. (2023): Poultry nutrition. Faculty of Agriculture Zemun.
- Kleyn F. J., Ciacciariello M. (2021): Future demands of the poultry industry: will we meet our commitments sustainably in developed and developing economies? *World's Poultry Sci J*, 77(2):267-78.
- Lam W. K., Zhong N. S., Tan W.C. (2003): Overview on SARS in Asia and the World. *Respirology*, 8:S2-S5.
- Marković R., Baltić M. (2018): Animal nutrition to functional food. Faculty of Veterinary Medicine, Naučna KMD.
- MPŠV RS (2023): Report on the state of agriculture in the Republic of Serbia in 2023, (Green book 2023.). Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management RS.
- Radulović S., Jokić Ž., Šefer D., Marković R., Perić D., Stevanović J., Mihailović N. (2024): Views on problems in poultry production and directions of future development. *Poultry Journal*, 58(8-9):44-56.
- Radulović S., Marković R., Petrujkić B., Šefer D. (2018): Meal optimization using software. 39th Seminar for innovations of veterinary knowledge, Proceedings, 159-167.
- Rulebook (2005): Veterinary Law. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 91/05, 30/10, 93/12, 17/19.
- Rulebook (2013): Law on Incentives in Agriculture and Rural Development. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 10/2013, 142/2014, 103/2015, 101/2016, 35/2023, 92/2023.
- Rulebook (2014): Agriculture and rural development strategy of the Republic of Serbia for the period 2014-2024. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 85/2014.
- Rulebook (2017): National program for agriculture of the Republic of Serbia for the period 2018 to 2020. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 85/2017.
- Rulebook (2022): National program for agriculture for the period 2022-2024. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 85/2022.
-

Rulebook (2023): Conclusion on the adoption of the IPARD III program for the Republic of Serbia for the period 2021-2027. The Official Gazette of the Republic of Serbia, 118/2023.

RZS (2012): 2012 Census of agriculture. Statistical Office of the Republic of Serbia.

RZS (2018): 2018 Census of agriculture. Statistical Office of the Republic of Serbia.

RZS (2020): 2020 Statistical yearbook. Statistical Office of the Republic of Serbia.

RZS (2023): 2023 Census of agriculture. Statistical Office of the Republic of Serbia.

Scanes C. (2007): The global importance of poultry. *Poult. Sci*, 86:1057.

DOI 10.7251/VETJSR2401165G

UDK 636.7.082.4:618.11-006

Оригинални научни рад

УЧЕСТАЛОСТ РЕПРОДУКТИВНИХ ПОРЕМЕЋАЈА ПАСА

**Иван ГАЛИЋ^{*}, Иван СТАНЧИЋ, Јован СПАСОЈЕВИЋ, Бојан ТОХОЉ,
Сандра НИКОЛИЋ, Вук ВРАЧАР, Михајло ЕРДЕЉАН, Тијана КУКУРИЋ,
Драгана ТОМАНИЋ, Зорана КОВАЧЕВИЋ**

Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Департман за ветеринарску
медицину, Нови Сад, Република Србија

^{*}Коресподентни аутор: Иван Галић, ivan.galic@polj.uns.ac.rs

Сажетак

Обољења и поремећаји репродуктивног тракта паса чести су у клиничкој ветеринарској пракси, а могућност примене терапије има кључну улогу за стварање будућег потомства. Свест власника кућних љубимаца о здравственом стању њихових животиња значајно се променила последњих година. С друге стране, због измењеног начина држања паса, они су склонији различитим здравственим поремећајима, а међу њима и поремећајима репродуктивног здравља. Када се испитују репродуктивни статуси паса увек је потребно узети детаљну анамнезу о историји репродуктивног здравља. У овој ретроспективној студији анализирани су подаци узети од 95 паса с патологијом репродуктивног тракта. Поред најчешћи поремећаја који се јављају у овој области, код ових паса забележена су и нека ретка урођена патолошка стања. Највећа учесталост репродуктивне патологије забележена је код женских (73%), а затим код мушких јединки (22%), док су неонатални пацијенти били најмање обухваћени овом врстом патологије (5%). Хируршка интервенција спроведена је у 71% случајева, док је фармакотерапијом интервенисано код 24% пацијената. У случајевима неонаталних поремећаја, могло се само констатовати угинуће штенета (5% случајева). Репродуктивна историја кује, мужјака и легла може дати одличне смернице за постојање генетске предиспозиције за развој стерилитета. Стога је ова ретроспективна студија спроведена у циљу приказа различитих репродуктивних поремећаја, могућих терапија различитих поремећаја, али и инциденце појављивања истих у односу на пол и старост. Свеобухватно, проблеми који се најчешће јављају у ветеринарској пракси, а односе се на патологију репродукције паса, дужи временски период остају слични. Позитиван ефекат код оваквих поремећаја проналази се у брзој и лакој дијагностици, али и све савременијим методама за њихово кориговање.

Кључне речи: стерилитет, фармакотерапија, хирургија, пси.

УВОД

Због велике жеље људи за кућним љубимцима, популација паса у већим градовима из године у годину се повећава. Добијање све већег броја здравог и за живот способног потомства паса, доводи и до повећања репродуктивних проблема одраслих паса који се користе у репродукцији. Управо је ово разлог због ког данашња ветеринарска делатност захтева употребу савремених метода за дијагностику и решавање патолошких процеса репродуктивног тракта паса. Многа од ових патолошких стања могу се појавити у било ком тренутку током репродуктивног живота паса. Да би се избегла погрешна терапија или непотребна одлагања, важно је да клиничар брзо препозна и разуме патологију најчешћих репродуктивних поремећаја (Ortega-Pacheco и сар., 2012). Гинеколошки или андролошки преглед паса у циљу утврђивања узрока неплодности треба обавити према утврђеној шеми, која укључује прикупљање анамнезе, клинички преглед, као и лабораторијске анализе (Holumbiovска и Stefanyk, 2018). Неплодност је привремени, продужени или трајни губитак репродуктивне способности (Павловић, 2018). Поремећаји репродуктивне функције узроковани су различитим етиолошким факторима: неправилна оплодња, стрес, болест појединих репродуктивних органа, инфективна болест и идиопатска неплодност (Holumbiovска и Stefanyk, 2018).

Репродуктивни поремећаји код паса могу бити урођени и стечени. Стечени репродуктивни поремећаји, у данашњој ветеринарској пракси (уз савремене дијагностичке процедуре) се много лакше могу уклонити, односно са њима се много лакше може управљати. Урођени поремећај, односно урођени стерилитет, у одређеном броју случајева приликом хируршког захвата може бити саниран, али се често тиме завршава и репродуктивна активност јединке. Неплодност женки паса јавља се у већем броју случајева у односу на мужјаке, али патолошка стања која се јављају код мужјака свакако не би требала да прођу без озбиљне опсервације и анализе (Станчић и Галић, 2021). Пораст инфертилитета може бити последица доместикације и употребе паса у различитим сферама у људске делатности, па се из тог разлога, веома велика пажња поклања и репродукцији кућних љубимаца (Станчић, 2012; Галић и сар., 2022). Колики утицај има сама доместикација указује чињеница се пси сматрају потомцима вука, али за разлику од паса, вучица има само један еструсни период током године (Nagashima и Songsasen, 2021), када и сам вук током тог периода производи сперматозоиде. Са друге стране, доместикација довела је до тога да женка пса најчешће има два/три еструса годишње, док мужјаци паса производе фертилне сперматозоиде током целе године (Ortega-Pacheco и сар., 2006; Станчић, 2012).

Током гравидитета и интраутериног развоја, већи број поремећаја се и даље веома тешко открива, а и када се дијагностикују, остају без могуће хируршке интервенције или фармакотерапије (Münnich и Küchenmeister, 2014; Pereira и сар., 2022). Урођени конгенитални стерилитет може се поделити на формативни и

функционални. За овакве облике стерилитета, са становишта ветеринарске праксе, терапија практично не постоји. Формативни поремећаји представљају грубе анатомске абнормалности, код којих функција репродуктивних органа не постоји. Формативни поремећаји се у том смислу могу поделити на тип када комплетно недостају репродуктивни органи и на тип када су поједини делови гениталног тракта рудиментирани (Павловић, 2018).

Главне процедуре истраживања за утврђивање узрока неплодности су: вагинални секрет, вагиноскопија, вагинална цитологија, микробиолошке студије, радиографија, хистероскопија, хистерографија, ултразвучни преглед, одређивање концентрације полних хормона у крви, али и квалитет и оцена ејакулата (Holumbiovска и Stefanyk, 2018; Станчић и Галић, 2021).

Патолошка стања репродуктивног тракта су уобичајени налази у ветеринарској пракси кућних љубимаца. Неке од ових промена, као што су пиометра, могу озбиљно утицати на репродуктивно здравље кућних љубимаца, која ако се не препозна и не лечи на време, може довести до угинућа животиње. Клиничари морају бити свесни различитости репродуктивне патологије и бити спремни да препознају оне који захтевају хитно лечење (Ortega-Pacheco и сар., 2012). Због свега наведеног, циљ ове ретроспективне студије је био да се анализирају подаци добијени од 95 паса са патологијом репродуктивног тракта.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Прегледана је медицинска документација Ветеринарске клинике (Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду), ради прикупљања информација о псима (мушке јединке, женске јединке и неонатални пацијенти, n=95): различите расне припадности, различите старости, за временски период од јануара 2021. до јануара 2023. године, са различитим репродуктивним проблемима. Обухваћени су сви случајеви патологије репродуктивног тракта, и они који су успешно санирани (терапија/хируршки захват), као и поремећаји који су откривени приликом хируршког захвата (царски рез/овариохистеректомија).

За сваког пацијента посебно, а на основу резултата општег клиничког прегледа, експлоративне хирургије, патохистолошког налаза, ултразвучне и рендген дијагностике, хормонског статуса, микробиолошког и цитолошког бриса, донешена је радна дијагноза за одређени репродуктивни поремећај. Чим је откривен одређени репродуктивни проблем, предложен је или хируршки захват или примена лекова. За извођење хируршког захвата све животиње су подвргнуте специјалистичком прегледу, анализи крви (комплетна крвна слика и биохемија), радиографском и ултразвучном прегледу, а по потреби рађена је и патохистолошка анализа, претходно узоркованих биоптата. Хируршки захвати изведени су у општој анестезији. Анестезиолошки протоколи (премедикација, индукција и одржавање опште анестезије) су употребљивани на основу

биолошких и здравствених карактеристика сваке јединке појединачно. У складу са претходно наведеним, формирану су различити анестезиолошки протоколи у којима су коришћена следећа средства: седативи (мидазолам, диазепам, ксилазин), општи ињекциони анестетици (пропофол, кетамин) и инхалациони анестетици за одржавање анестезије (севофлуран, изофлуран).

За потребе формирања базе података, анализе резултата и статистичке обраде података употребљен је Microsoft Office Excel (v2019).

РЕЗУЛТАТИ

Деведесет и пет паса (женске јединке, мушке јединке и неонатални пацијенти) у периоду од две године показало је репродуктивне поремећаје.

Карактеристике пацијената приказане су у Табели 1.

Табела 1 Карактеристике пацијената

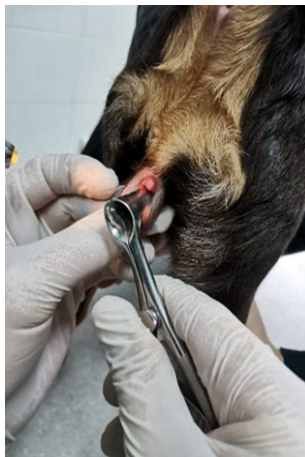
Параметар	Подгрупа	Инциденца
Пацијент	Женска јединка	73%
	Мушка јединка	22%
	Неонатални пацијент	5%
	Старост од 5 до 10 година	38%
	Старост < 5 година	31%
	Старост > 10 година	28%
Репродуктивни поремећаји мушких јединки	Крипторхизам	14%
	Обољења простате	4%
	Тумори тестиса	2%
	Пролапсус пениса	1%
	Хипоспадија	1%
Репродуктивни поремећаји женских јединки	Тумори млечне жлезде	26%
	Псеудогравидитет	13%
	Пиометра	10%
	Пролапсус вагине	5%
	Маститис	5%
	Вулвовагинитис	3%
	Цисте јајника (откривене током кастрације)	2%
	Хематометра	2%
	Хермафродитизам	1%
	Мацерација	1%
	Ректовагинална фистула	1%
	Повреде вулве	1%
	Синдром заосталог јајника	1%
		1%

	Трансмисибилни венерични тумор (ТВТ) Тумори јајника	
Поремећаји неонаталних пацијената откривени након царског реза/партуса	Наказна стања	2%
	Анасарка	2%
	Гастрошиза	1%
Предузете мере	Хируршки третман	71%
	Фармакотерапија	24%
	Констатовано угинуће	5%
Стерилитет	Стечени	83%
	Урођени	17%

Највећа учесталост репродуктивних проблема забележена је код женских јединки (73%), затим код мушких јединки (22%), а најмање код неонаталних пацијената (5%). Пацијенти су по старости подељени у три групе. Прву групу су чинили пацијенти старости преко десет година (28%), другу групу пацијенти између пет и десет година (38%), а последњу пацијенти старости испод пет година (31%). Од репродуктивних проблема забележени су следећи: тумори млечне жлезде, обољења простате (цистичне промене и бенигна хиперплазија) (Слика 1), крипторхизам, хермафродитизам (Слика 2), цисте јајника (Слика 3), тумори тестиса (Слика 4), пиометра, хематометра, мацерација, наказна стања, анасарка, гастрошиза (Слика 5), вулвовагинитис (Слика 6), псеудогравидитет, ректовагинална фистула, повреде вулве, синдром заосталог јајника, пролапсус вагине, маститис, пролапсус пениса, хипоспадија, трансмисибилни венерични тумор, тумори јајника.



Слика 1 Ултразвучна дијагностика цистичне промене на простати пса



Слика 2 Вагинални преглед пса и дијагностика клиторомегалије код хермафродитизма



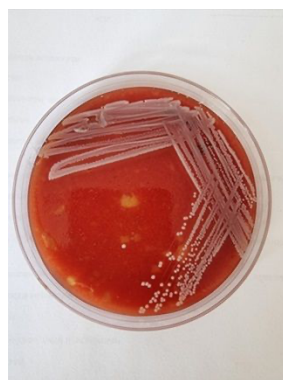
Слика 3 Случајан налаз солитарне цисте на јајнику старије кује приликом овариохистеректомије



Слика 4 Тумор тестиса
(десно промењен тестис)



Слика 5 Гастрошиза
неонаталног пацијента,
непосредно након
царског реза



Слика 6 Изолација и
идентификација
узročника
вулвовагинитиса на
крвном агару у
лабораторији за
микробиологију

Фотографије: Иван Галић

Код женских јединки од свих евидентираних репродуктивних поремећаја највише су забележени тумори млечних жлезда (26%), псеудогравидитет (13%) и пиометра (10%).

Код мушких јединки највећи број евидентираних промена забележен је за крипторхизам (13%).

Репродуктивне аномалије код неонаталних пацијената евидентиране су укупно у 5% случајева, и то наказно стање (2%), анасарка (2%) и гастрошиза (1%).

Хируршка интервенција санације спроведена је у 71% случајева, док је протоколима фармакотерапије интервенисано код 24% пацијента. У случајевима неонаталних поремећаја, могло се само констатовати угинуће штенета, што је забележено у 5% случајева.

Стечени стерилитет јавио се у 83% случајева, са највећим уделом код старијих животиња (група јединки старости од 5 до 10 година, као и група > 10 година), док се урођени (17%) у највећем броју случајева открио код пацијената старости испод пет година (хипоспадија, хермафродитизам, ректовагинална фистула, гастрошиза).

ДИСКУСИЈА

Ретроспективне студије, сличне нашој студији, откривају учесталост различитих репродуктивних поремећаја у популацији паса, што је корисно за дизајнирање профилактичких и клиничких стратегија, али и за саветовање власника кућних љубимаца о проблемима узгоја и репродукције паса (Hadiya и сар., 2021). У нашој студији забележили смо туморе млечних жлезда (24), тумор јајника (1),

трансмисибилни венерични тумор (1) и два тумора тестиса пса. Одрасле животиње старије од 5 година су највише погођене, али већина тумора репродуктивног тракта не представља расну предиспозицију (Veiga и сар., 2009). Резултати студије (Veiga и сар., 2009), слични су резултатима наше студије где је највећи број случајева свих репродуктивних патолошких стања забележен у групи животиња између 5 и 10 година (38%), док се 28% свих репродуктивних поремећаја јавило код паса старијих од 10 година. Што се женки паса тиче, поред тумора млечне жлезде, најчешће забележени тумори који се јављају, јављају се у материци или вагини (Veiga и сар., 2009). У нашој ретроспективној студији није забележен ни један тумор материце, док су забележени тумор јајника и ТВТ који заузима вагиналну слузокожу и представља један од најчешћих вагиналних тумора у тропским крајевима и земљама у развоју (Ortega-Pacheco и сар., 2007; Галић и сар., 2019). Неоплазме вагине и вулве представљају 2,4% - 3% свих тумора код паса и већина њих је бенигна (McEntee, 2002). Пролапсуси вагине (у нашој студији забележено 5 случајева) и клиторомегалија код хермафродитизма (забележен један случај у нашем истраживању), могу се заменити са туморима вагине, па приликом њихове дијагностике и коначне дијагнозе треба бити веома обазрив (Ortega-Pacheco и сар., 2012). Најчешће пријављени тумори мужјака паса су тумори тестиса, препуцијума и тумори простате (Veiga и сар., 2009). Међутим, у овом истраживањусу пријављена само два тумора тестиса. Истраживање из 2022. године, које је група аутора спровела на десет паса (Спасојевић и сар., 2022), показало је да се билатерални крипторхизам јавио код 20%, док је унилатерални забележен код 80% пацијената, док се код једног пса од основне дијагнозе заостајања тестиса последично јавио семином тип тумора тестиса. У овој студији нису раздвајани типови крипторхизма, али се од свих патолошких промена, крипторхизам јавио у 14% случајева и представља најзаступљеније патолошко стање мушких јединки које су ушле у ово истраживање.

Хипоспадија, абнормални положај отвора уретре, сматра се ретком урођеном малформацијом репродуктивних органа мушких паса. У ретроспективној студији из једне ветеринарске клинике у Пољској (2006-2017), пријављено је укупно 10 извештаја о хипоспадији пениса (0,05%), приликом увида у 19.950 медицинских картона мушких паса (Switonski и сар., 2018). У приказу ове студије, за две године на Ветеринарској клиници Пољопривредног факултета у Новом Саду, пријављен је један случај хипоспадије.

Ризици од појаве патолошких процеса на јајницима, расту пропорционално са старошћу куја, што поставља питање оптималне старости куја за гонадектомију (Bostedt и сар., 2013). Синдром засталога јајника је јатрогено стање које настаје приликом грешке у подвезивању јајника приликом овариектомије или овариохистеректомије (Wallace, 1991). Такође, може да дође до испадања ткива јајника приликом овог хируршког захвата у абдомен кује и да том приликом ткиво јајника остане активно (Terazono и сар., 2012). Поред ултрасонографије, која није увек најсигурнија метода (Sontas и сар., 2007), мерење активности естрадиола и

прогестерона даје јаснију слику дијагностике овог синдрома (Ortega-Pacheco и сар., 2012). У истраживању три клинике из Сједињених Америчких Држава (Ball и сар., 2010) у периоду од седам година (2000-2007) пријављено је свега деветнаест паса са синдромом заосталог јајника, док је у овој студији прегледом медицинске документације за период од две године, забележен један случај синдрома заосталог јајника. Ановулаторне функционалне фоликуларне цисте јајника су уобичајени случајни налази код старијих куја, посебно код оних које никада нису парене или нису имале легло, а могу бити солитарне или мултипле (Schlafer и Miller, 2007; Ortega-Pacheco и сар., 2012; Станчић, 2012). У истраживању из 2017. године (Maya-Pulgarin и сар., 2017), спроведено на 3.600 куја које су подвргнуте овариохистеректомији, пријављено је 10,5% фоликуларних циста, док су у овој студији забележена само два (2%) налаза циста на јајницима.

Новије истраживање из 2021. године, пријављује 13,2% маститиса куја (Lecton и сар., 2021), док се у овом истраживању маститис јавио у 5% случајева. Са друге стране, обољење које је директно везано за млечну жлезду куја јесте псеудогравидитет. Клинички симптоми се крећу од благог увећања вимена и лактогенезе до појаве јасних знакова праве гравидности са манифестацијом партуса, прављења гнезда, губитком апетита, апатијом, емотивном везаношћу за неке непокретне предмете и снажном лактацијом (Станчић и сар. 2012а), и инциденцом од 4,43% (Dhurvey и сар., 2022) док је инциденца у нашем истраживању 13%. У малој пракси, пиометра је једно од најчешћих обољења материце куја. Појава пиометре значајно се повећава после 5. године старости, али могу да оболе и млађе кује. Поред старости куја, такође и раса има значајног утицаја, али и годишње доба (Станчић и сар., 2008; Станчић и сар., 2012б). У овом истраживању забележено је 10% случајева пиометре, што су поред 2% случајева хематометре, једини случајеви патолошких стања материце. У ретроспективној студији која је обухватила 599 паса, аутори пријављују да је током свог живота 79 паса (13,2%) развило пиометру, а 160 (26,7%) тумор млечне жлезде (Beaudu-Lange и сар., 2021), што је у складу са резултатима овог истраживања, где се пиометра јавила у 9 случајева (10%), а тумори млечне жлезде у 24 случајева (26%).

Неонаталне болести и губици младунаца су чест и неизбежан проблем у ветеринарској пракси. Морбидитет и морталитет се крећу, према литератури, од 5 до 35% (Münnich и Küchenmeister, 2014). У овој ретроспективној студији код неонаталних поремећаја, могло се само констатовати угинуће штенета (наказна стања, анасарка и гастрошиза), што је забележено у 5% случајева. Међу неинфективним узроцима, поред хипоксије током рођења, хипотермија, хипогликемија и дехидратација су највише одговорни за болести и губитке штенета у првим данима живота, па је ултразвучна процена виталности младунаца током гравидитета мајке, веома значајна у ветеринарској пракси (Pereira и сар., 2022; Галић и сар., 2022).

ЗАКЉУЧАК

Некадашњи приступ традиционалног лечења репродуктивних поремећаја паса, подразумевао је овариохистеректомију или орхиектомију. Данас су различите фармакотерапијске групе много шире, за специфичне проблеме у вези са репродукцијом паса, али са друге стране, хируршке технике санације различитих поремећаја су и даље једини начин отклањања многих патолошких стања у репродукцији паса. Свеобухватно, проблеми који се најчешће јављају у ветеринарској пракси, а односе се на патологију репродукције паса, дужи временски период остају исти. Позитиван ефекат код оваквих поремећаја, проналази се у брзој и лакој дијагностици, али и све савременијим методама за њихово кориговање.

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Ball R. L., Birchard S. J., May L. R., Threlfall W. R., Young G. S. (2010): Ovarian remnant syndrome in dogs and cats: 21 cases (2000-2007). *JAVMA*, 236(5):548-553.
- Beaudu-Lange C., Larrat S., Lange E., Lecoq K., Nguyen F. (2021): Prevalence of Reproductive Disorders including Mammary Tumors and Associated Mortality in Female Dogs. *Vet. Sci.*, 8(9):184.
- Bostedt H., Jung C., Wehrend A., Boryzcko Z. (2013): Klinische und endokrinologische Befunde von Hündinnen mit Ovarialzystensyndrom. Clinical and endocrinological findings of bitches with ovarian cyst syndrome. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 155(10):543-50.
- Галић И., Николић С., Спасојевић Ј., Кукурић Т., Тешин Н., Родић С., Поповић Н., Терзић М. (2022): Ултразвучна процена виталности фетуса пса - приказ случаја. *Ветеринарски преглед*, 3(1):28-33.
- Галић И., Станчић И., Спасојевић Ј., Тохол Б., Цинцовић М., Кукурић Т. (2019): Примена винкрестина у лечењу трансмисибилног венеричног тумора код пса-приказ случаја. 30 саветовање ветеринара Србије, Зборник радова и кратких садржаја, 349-352.
- Dhurvey M., Nema S. P., Shivhare M., Gupta V. K. (2022): Incidence of various reproductive disorders in different breeds of bitches. *J. Pharm. Innov.*, 11(3):886-888.
- Hadiya H. D., Patel D. M., Parmar J. J. (2021): Prevalence of major reproductive disorders in canines with reference to age, sex and breed in central Gujarat. *IJVSBT*, 17(1):23-25.
- Holumbiovska T. V., Stefanyk V. Y. (2018): Disorders of reproductive function in female dogs and methods of diagnostic. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. *Series: Vet. Sci.*, 20(83):385-395.
-

- Lecton J., Cornelius A. J., Moxon R., Russenberger J., Diel de Amorim M., Cheong S. H. (2021): Incidence and risk factors for canine mastitis and metritis in two guide dog populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 231:106802.
- Maya-Pulgarin D., Gonzalez-Dominguez M. S., Aranzazu-Taborda D., Mendoza N., Maldonado-Estrada J. G. (2017): Histopathologic findings in uteri and ovaries collected from clinically healthy dogs at elective ovariohysterectomy: a cross-sectional study. *J. Vet. Sci.*, 30;18(3):407-414.
- McEntee M. (2002): Reproductive oncology. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.*, 17:133-49.
- Münnich A., Küchenmeister U. (2014): Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: Cornerstones of practical approach. *Reprod. Domest. Anim.*, 49:64-74.
- Nagashima, J. B., Songsasen N. (2021): Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, 11(3):653.
- Ortega-Pacheco A., Gutiérrez-Blanco E., Jiménez-Coello M. (2012): Common lesions in the female reproductive tract of dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(3):547-559.
- Ortega-Pacheco A., Rodriguez-Buenfil J. C., Segura-Correa J. C., Montes de Oca-Gonzalez A. R., Jimenez-Coello M. (2006): Prevalence of fetal resorption in stray dogs in Yucatan, Mexico. *J. Small Anim. Pract.*, 47:266-9.
- Ortega-Pacheco A., Segura-Correa J.C., Jimenez-Coello M., Linde Forsberg C. (2007): Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology*, 67(2):382-90.
- Павловић В. (2018): Порођиљство, стерилитет и вештачко осемењавање. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
- Pereira K. H. N. P., da Mata Fuchs K., Hibar V. Y., dos Santos Correia L. E. C., Ferreira J. C. P., de Souza F. F., Machado L. H. A., Chiacchio S. B., Lourenço M. L. G. (2022): Neonatal sepsis in dogs: Incidence, clinical aspects and mortality. *Theriogenology*, 177:103-115.
- Schlafer D. H., Miller R. B. (2007): Female genital system. In Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals, vol. 3. Eds. Maxie M. G., Saunders-Elsevier, 429-564.
- Sontas B. H., Gürbulak K., Ekici H. (2007): Síndrome de remanente ovárico en la perra: revision bibliográfica. *Arch. Med. Vet.*, 39:99-104.
- Спасојевић Ј., Галић И., Тохол Б., Станчић И., Николић С., Давидов И., Кукурић Т., Поповић Н. (2022): Крипторхизам код паса. *Ветеринарски журнал Републике Српске*, 22(1-2):127-141.
- Станчић И. (2012): Репродукција паса и мачака. Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду.
- Станчић И., Галић И. (2021): Поремећај репродукције мужјака пса – проблеми ветеринара и одгајивача. 32 саветовање ветеринара Србије, Зборник радова и кратких садржаја, 309-313.
-

- Станчић И., Стеванчевић М., Лако Б., Јовичин М., Тохол Б. (2008): Утицај расе на старосну доб у којој се најчешће јавља пиометра код куја. *Вет. Гласник*, 62(3-4):233-240.
- Станчић И., Стеванчевић О., Станчић Ј., Апић И. (2012б): Утицај сезоне на појаву пиометре код куја. *Вет. Гласник*, 66(1-2):143-150.
- Станчић И., Стеванчевић М., Тохол Б., Ердељан М., Цинцовић М. (2012а): Поремећаји репродукције и њихов утицај на ефикасност употребе код ловних куја. Међународни симпозијум о ловству, Савремени аспекти одрживог газдовања популацијама дивљачи, Зборник радова, 134-135.
- Switonski M., Dzimira S., Aleksiewicz R., Szczerbal I., Nowacka-Woszuik J., Krzeminska P., Deska T., Nizanski W. (2018): Hypospadias is not rare in dogs: five new cases, a retrospective study, and a review of the literature. *Sexual Development*, 12(5):244-250.
- Terazono T., Inoue M., Kaedei Y., Tanihara F., Namula Z., Viet V. L., Taura Y., Takagi M., Takuma T., Otoi T. (2012): Assessment of canine ovaries autografted to various body sites. *Theriogenology*, 77:131-8.
- Veiga G. A. L., Barbosa A., D'Oliveira K. S., Brito C., Kitahara F., Frignani J. F., Pereira F. P., Carramenha C. P. (2009): Retrospective Study of Tumors at the Genital Tract of Dogs Presented at the Veterinary Hospital of Unisa During the Period of February 2000 to December 2008. World Small Animal Veterinary Association World Congress, Proceedings.
- Wallace M. S. (1991): The ovarian remnant syndrome in the bitch and queen. *Vet. Clin. North Am.*, 21:501-7.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401176G

UDK 636.7.082.4:618.11-006

Original Scientific Paper

FREQUENCY OF REPRODUCTIVE DISORDERS IN DOGS

Ivan GALIĆ*, Ivan STANČIĆ, Jovan SPASOJEVIĆ, Bojan TOHOLJ, Sandra NIKOLIĆ, Vuk VRAČAR, Mihajlo ERDELJAN, Tijana KUKURIĆ, Dragana TOMANIĆ, Zorana KOVAČEVIĆ

University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad, Republic of Serbia

*Corresponding author: Ivan Galić, ivan.galic@polj.uns.ac.rs

Summary

Diseases and reproductive tract disorders are common in clinical veterinary practice, and the possibility of applying therapy plays a key role for future offspring. The awareness of pet owners about the health status of their animals has changed significantly in recent years. On the other hand, due to the changed way of keeping dogs, they are more prone to various health disorders, including reproductive health disorders. When examining the reproductive status of dogs, it is always necessary to take a detailed history of reproductive health. In this retrospective study, data taken from 95 dogs with reproductive tract pathology were analyzed. In addition to the most common reproductive disorders, some rare congenital pathological conditions were also detected in these dogs. The highest frequency of reproductive pathology was recorded in females (73%), followed by males (22%), while neonatal patients were least affected by this type of pathology (5%). Surgical intervention was performed in 71% of cases, while pharmacotherapy was used in 24% of patients. In cases of neonatal disorders, only the death of the puppy was noted (5% of cases). The reproductive history of the bitch, the male and the litter can provide excellent guidelines for the existence of a genetic predisposition to the development of sterility. Therefore, this retrospective study was conducted with the aim of presenting different reproductive disorders, possible therapies for different disorders, but also the incidence of their occurrence in relation to gender and age. Overall, the problems that most often occur in veterinary practice, and relate to the pathology of canine reproduction, remain similar for a long period of time. A positive effect in such disorders can be found in quick and easy diagnosis, but also in increasingly modern methods for their correction.

Keywords: sterility, pharmacotherapy, surgery, dogs.

INTRODUCTION

Due to the great need of people to have pets, the dog population in major cities is increasing year by year. Obtaining an increasing number of healthy and viable dog

offspring also leads to an increase in reproductive problems of adult dogs used in reproduction. This is the reason why today's veterinary practice requires the use of modern methods for diagnosing and resolving pathological processes of the reproductive tract of dogs. Many of these pathological conditions can occur at any time during the reproductive life of dogs. In order to avoid incorrect therapy or unnecessary delays, it is important for the clinician to quickly recognize and understand the pathology of the most common reproductive disorders (Ortega-Pacheco et al., 2012). Gynecological or andrological examination of dogs in order to determine the cause of infertility should be performed according to an established scheme, which includes anamnesis, clinical examination, as well as laboratory analyses (Holumbiovska and Stefanyk, 2018). Infertility is a temporary, prolonged or permanent loss of reproductive ability (Pavlović, 2018). Reproductive function disorders are caused by various etiological factors: inadequate fertilization, stress, disease of individual reproductive organs, infectious disease and idiopathic infertility (Holumbiovska and Stefanyk, 2018).

Reproductive disorders in dogs can be congenital and acquired. Acquired reproductive disorders, in today's veterinary practice (with modern diagnostic procedures), can be much easier to remove, that is, they can be much easier to manage. Congenital disorders, or congenital sterility, can be repaired in a certain number of cases during surgery, but this often ends the reproductive activity of the individual. Infertility of female dogs occurs more often than in males, but pathological conditions that occur in males should also treat with serious observation and analysis (Stančić and Galić, 2021). The increase in infertility may be a consequence of the domestication and use of dogs in different human activities, and for this reason, great attention is given to the reproduction of pets (Stančić, 2012; Galić et al., 2022). The impact of domestication itself is indicated by the fact that dogs are considered descendants of wolves, but unlike dogs, the female wolf has only one estrous period per year (Nagashima and Songsasen, 2021), and that is the period when the wolf produces sperm. On the other hand, domestication has led to the fact that female dogs most often have two/three estrus periods per year, while male dogs produce fertile sperm throughout the year (Ortega-Pacheco et al., 2006; Stančić, 2012).

During pregnancy and intrauterine development, a large number of disorders are very difficult to detect, and even when diagnosed, they remain without possible surgical intervention or pharmacotherapy (Münnich and Küchenmeister, 2014; Pereira et al., 2022). Congenital sterility can be divided into formative and functional. For these forms of sterility, from the point of view of veterinary practice, therapy practically does not exist. Formative disorders represent gross anatomical abnormalities, in which the function of the reproductive organs does not exist. In this sense, formative disorders can be divided into a type when the reproductive organs are completely missing and a type when certain parts of the genital tract are rudimentary (Pavlović, 2018).

The main procedures for determining the cause of infertility are: vaginal secretions, vaginoscopy, vaginal cytology, microbiological studies, radiography, hysteroscopy,

hysterography, ultrasound examination, determination of sex hormone concentrations in the blood, as well as the quality and assessment of ejaculate (Holumbiovskaa and Stefanyk, 2018; Stančić and Galić, 2021).

Pathological conditions of the reproductive tract are common findings in veterinary practice of pets. Some of these changes, such as pyometra, can seriously affect the reproductive health of pets, which, if not recognized and treated in time, can lead to the death of the animal. Clinicians must be aware of the diversity of reproductive pathology and be prepared to recognize those that require urgent treatment (Ortega-Pacheco et al., 2012). For all of the above reasons, the aim of this retrospective study was to analyze data obtained from 95 dogs with reproductive tract pathology.

MATERIALS AND METHODS

The medical documentation of the Veterinary Clinic (Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad) was reviewed to collect information on dogs (males, females and neonatal patients, n=95): different breeds, different ages, for the period from January 2021 to January 2023, with different reproductive problems. All cases of reproductive tract pathology were included, and those that were successfully treated (therapy/surgery), as well as disorders that were detected during surgery (cesarean section/ovariohysterectomy). For each patient separately, and based on the results of a general clinical examination, exploratory surgery, pathohistological findings, ultrasound and X-ray diagnostics, hormonal status, microbiological and cytological smears, a diagnosis for a specific reproductive disorder was made. As soon as a specific reproductive problem was detected, either surgery or medication was suggested. For the surgical procedure, all animals underwent a specialist examination, blood analysis (complete blood count and biochemistry), radiographic and ultrasound examination, and, if necessary, pathohistological analysis of previously sampled biopsies was performed. Surgical procedures were performed under general anesthesia. Anesthesia protocols (premedication, induction and maintenance of general anesthesia) were used based on the biological and health characteristics of each individual. In accordance with the above, different anesthesia protocols were formed in which the following agents were used: sedatives (midazolam, diazepam, xylazine), general injectable anesthetics (propofol, ketamine) and inhalation anesthetics for maintenance of anesthesia (sevoflurane, isoflurane).

Microsoft Office Excel (v2019) was used for the purposes of database creation, analysis of results, and statistical data processing.

RESULTS

Ninety-five dogs (females, males, and neonatal patients) over a two-year period showed reproductive abnormalities.

Patient characteristics are shown in Table 1.

Table 1 Patient characteristics

Parameter	Subgroup	Incidence
Patient	A female individual	73%
	A male individual	22%
	Neonatal patient	5%
	Age from 5 to 10 years	38%
	Age < 5 years	31%
	Age > 10 years	28%
Reproductive disorders of male individuals	Cryptorchidism	14%
	Diseases of the prostate	4%
	Testicular tumors	2%
	Penile prolapse	1%
	Hypospadias	1%
Reproductive disorders of female individuals	Tumors of the mammary gland	26%
	Pseudopregnancy	13%
	Pyometra	10%
	Vaginal prolapse	5%
	Mastitis	5%
	Vulvovaginitis	3%
	Ovarian cysts (discovered during castration)	2%
	Hematometra	2%
	Hermaphroditism	1%
	Maceration	1%
	Rectovaginal fistula	1%
	Injuries of the vulva	1%
	Residual ovary syndrome	1%
	Transmissible venereal tumor (TVT)	1%
	Ovarian tumors	1%
Disorders of neonatal patients detected after caesarean sectin/delivery	Abnormal conditions	2%
	Anasarca	2%
	Gastroschisis	1%
Measures taken	Surgical treatment	71%
	Pharmacotherapy	24%
	Confirmed death	5%
Sterility	Acquired	83%
	Congenital	17%

The highest incidence of reproductive problems was recorded in females (73%), followed by males (22%), and the lowest in neonatal patients (5%). Patients were divided into three groups by age. The first group consisted of patients over ten years of age (28%), the second group consisted of patients between five and ten years of age

(38%), and the last group consisted of patients under five years of age (31%). The following reproductive problems were recorded: mammary gland tumors, prostate diseases (cystic changes and benign hyperplasia) (Figure 1), cryptorchidism, hermaphroditism (Figure 2), ovarian cysts (Figure 3), testicular tumors (Figure 4), pyometra, hematometra, maceration, congenital conditions, anasarca, gastroschisis (Figure 5), vulvovaginitis (Figure 6), pseudogravidity, rectovaginal fistula, vulva injuries, ovarian residual syndrome, vaginal prolapse, mastitis, penile prolapse, hypospadias, transmissible venereal tumor, ovarian tumors.



Figure 1 Ultrasound diagnosis of cystic changes in the dog's prostate

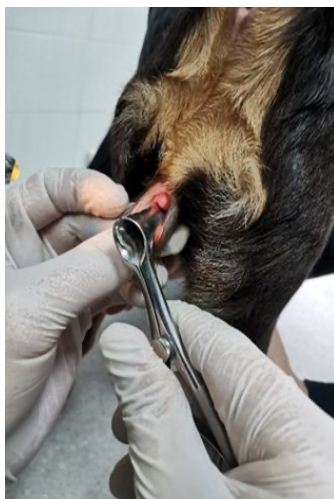


Figure 2 Vaginal examination of a dog and diagnosis of clitoromegaly in hermaphroditism



Figure 3 Incidental finding of a solitary ovarian cyst in an elderly bitch during ovariohysterectomy



Figure 4 Testicular tumor (right-sided changed testicle)



Figure 5 Gastroschisis in a neonatal patient, immediately after cesarean section

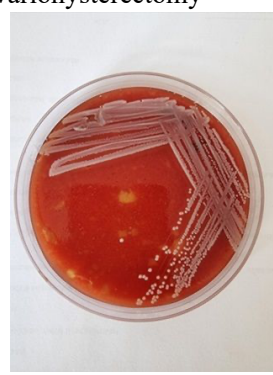


Figure 6 Isolation and identification of the causative agent of vulvovaginitis on blood agar in the microbiology laboratory

Photos: Ivan Galić

In females, the most common reproductive disorders were mammary gland tumors (26%), pseudogravidity (13%) and pyometra (10%).

In males, the most common disorder was cryptorchidism (13%).

Reproductive anomalies in neonatal patients were recorded in a total of 5% of cases, namely, congenital malformation (2%), anasarca (2%) and gastroschisis (1%).

Surgical intervention was performed in 71% of cases, while pharmacotherapy protocols were used in 24% of patients. In cases of neonatal disorders, only the death of the puppy was noted, which was recorded in 5% of cases.

Acquired sterility occurred in 83% of cases, with the highest proportion in older animals (group of individuals aged 5 to 10 years, as well as the group > 10 years), while congenital sterility (17%) was detected in the majority of cases in patients under five years of age (hypospadias, hermaphroditism, rectovaginal fistula, gastroschisis).

DISCUSSION

Retrospective studies, similar to our study, reveal the frequency of various reproductive disorders in the dog population, which is useful for creating prophylactic and clinical strategies, but also for advising pet owners on breeding and reproduction problems in dogs (Hadiya et al., 2021). In our study, mammary gland tumors (24), ovarian tumor (1), transmissible venereal tumor (1) and two testicular tumors in dogs were recorded. Adult animals older than 5 years are most affected, but most reproductive tract tumors do not represent a breed predisposition (Veiga et al., 2009). The results of the study Veiga et al. (2009), are similar to the results of our study where the highest number of cases of all reproductive pathological conditions was recorded in the group of animals between 5 and 10 years of age (38%), while 28% of all reproductive disorders occurred in dogs older than 10 years. In female dogs, besides mammary gland tumors, the most commonly reported tumors are those of the uterus or vagina (Veiga et al., 2009). In our retrospective study, no uterine tumors were reported, while ovarian tumors and TVT, which invades the vaginal mucosa and is one of the most common vaginal tumors in tropical regions and developing countries, were reported (Ortega-Pacheco et al., 2007; Galić et al., 2019). Vaginal and vulva neoplasms account for 2.4% - 3% of all tumors in dogs and most of them are benign (McEntee, 2002). Vaginal prolapse (5 cases were recorded in our study) and clitoromegaly in hermaphroditism (one case was recorded in our study) can be mixed with vaginal tumors, so great attention should be taken in their final diagnosis (Ortega-Pacheco et al., 2012). The most commonly reported tumors in male dogs are tumors of the testicles, foreskin, and prostate (Veiga et al., 2009). However, only two testicular tumors were reported in this study. A study obtained in year 2022, conducted by the authors on ten dogs (Spasojević et al., 2022), showed that bilateral cryptorchidism occurred in 20%, while unilateral cryptorchidism was recorded in 80% of patients, while in one dog, a seminoma type of testicular tumor subsequently occurred after the primary diagnosis of undescended testicle. This study did not distinguish types of cryptorchidism, but of all pathological changes,

cryptorchidism occurred in 14% of cases and was the most common pathological condition of male individuals in this study.

Hypospadias, an abnormal position of the urethral opening, is considered a rare congenital malformation of the male reproductive organs of dogs. In a retrospective study from a veterinary clinic in Poland (2006-2017), a total of 10 cases of penile hypospadias (0.05%) were reported, when reviewing 19,950 medical records of male dogs (Switonski et al., 2018). In the review of this study, one case of hypospadias was reported in two years at the Veterinary Clinic of the Faculty of Agriculture in Novi Sad. The risk of developing pathological processes in the ovaries increases proportionally with the age of the bitch, which raises the question of the optimal age of the bitch for gonadectomy (Bostedt et al., 2013). Residual ovary syndrome is an iatrogenic condition that occurs when an error occurs in tying the ovaries during oophorectomy or ovariohysterectomy (Wallace, 1991). Also, ovarian tissue can fall out into the abdomen of the bitch during this surgical procedure, and the ovarian tissue can remain active (Terazono et al., 2012). In addition to ultrasonography, which is not always the safest method (Sontas et al., 2007), measuring the activity of estradiol and progesterone provides a clearer picture of the diagnosis of this syndrome (Ortega-Pacheco et al., 2012). In a study of three clinics in the United States (Ball et al., 2010) over a seven-year period (2000-2007), only nineteen dogs with residual ovary syndrome were reported, while in this study, a review of medical records over a two-year period recorded one case of residual ovary syndrome. Anovulatory functional follicular ovarian cysts are common incidental findings in older bitches, especially those that have never been mated or have not had a litter, and may be solitary or multiple (Schlafer and Miller, 2007; Ortega-Pacheco et al., 2012; Stančić, 2012). In a study done in year 2017 (Maya-Pulgarin et al., 2017), conducted on 3,600 bitches that underwent ovariohysterectomy, 10.5% of follicular cysts were reported, while in this study only two (2%) ovarian cysts were found.

A more recent study from 2021 reported 13.2% mastitis in bitches (Lecton et al., 2021), while in this study mastitis occurred in 5% of cases. On the other hand, a disease directly related to the mammary gland of bitches is pseudopregnancy. Clinical symptoms range from mild udder enlargement and lactogenesis to the appearance of clear signs of true pregnancy with the manifestation of parturition, nest building, loss of appetite, apathy, emotional attachment to some immovable objects and strong lactation (Stanić et al. 2012a), and an incidence of 4.43% (Dhurvey et al., 2022) while the incidence in our study was 13%. In small practice, pyometra is one of the most common uterine diseases in bitches. The incidence of pyometra increases significantly after the age of 5, but younger bitches can also be affected. In addition to the age of the bitches, the breed also has a significant influence, as does the season (Stanić et al., 2008; Stanić et al., 2012b). In this study, 10% of cases of pyometra were recorded, which, in addition to 2% of cases of hematometra, were the only cases of pathological uterine conditions. In a retrospective study that included 599 dogs, the authors report that 79 dogs (13.2%) developed pyometra during their lifetime, and 160 (26.7%)

developed mammary gland tumors (Beaudu-Lange et al., 2021), which is in line with the results of this study, where pyometra occurred in 9 cases (10%) and mammary gland tumors in 24 cases (26%).

Neonatal diseases and puppies losses are a common and unavoidable problem in veterinary practice. Morbidity and mortality range, according to the literature, from 5 to 35% (Münnich and Küchenmeister, 2014). In this retrospective study of neonatal disorders, only puppies deaths (deformities, anasarca and gastroschisis) could be noted, which was recorded in 5% of cases. Among non-infectious causes, in addition to hypoxia during birth, hypothermia, hypoglycemia and dehydration are most responsible for diseases and puppies losses in the first days of life, so ultrasound assessment of pup vitality during maternal pregnancy is very important in veterinary practice (Pereira et al., 2022; Galić et al., 2022).

CONCLUSION

The traditional approach to treating reproductive disorders in dogs used to involve ovariohysterectomy or orchiectomy. Nowadays, the various pharmacotherapeutic groups are much broader for specific problems related to canine reproduction, but on the other hand, surgical techniques for the repair of various disorders are still the only way to eliminate many pathological conditions in canine reproduction. Overall, the problems that most often occur in veterinary practice, and relate to the pathology of canine reproduction, remain the same for a long period of time. The positive effect in such disorders is found in quick and easy diagnosis, but also in modern methods for their correction.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ball R. L., Birchard S. J., May L. R., Threlfall W. R., Young G. S. (2010): Ovarian remnant syndrome in dogs and cats: 21 cases (2000-2007). *JAVMA*, 236(5):548-553.
- Beaudu-Lange C., Larrat S., Lange E., Lecoq K., Nguyen F. (2021): Prevalence of Reproductive Disorders including Mammary Tumors and Associated Mortality in Female Dogs. *Vet. Sci.*, 8(9):184.
- Bostedt H., Jung C., Wehrend A., Boryzcko Z. (2013): Klinische und endokrinologische Befunde von Hündinnen mit Ovarialzystensyndrom. Clinical and endocrinological findings of bitches with ovarian cyst syndrome. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 155(10):543-50.
- Galić I., Nikolić S., Spasojević J., Kukurić T., Tešin N., Rodić S., Popović N., Terzić M. (2022): Ultrasonographic assesment of canine fetal vitality – case report. *Veterinary Review*, 3(1):28-33.
-

- Galić I., Stančić I., Spasojević J., Toholj B., Cincović M., Kukurić T. (2019): The use of vincristine therapy in transmissible venereal tumor affected dog – case report. 30th Conference of Serbian Veterinarians, Proceedings and short contents, 349-352.
- Dhurvey M., Nema S. P., Shivhare M., Gupta V. K. (2022): Incidence of various reproductive disorders in different breeds of bitches. *J. Pharm. Innov.*, 11(3):886-888.
- Hadiya H. D., Patel D. M., Parmar J. J. (2021): Prevalence of major reproductive disorders in canines with reference to age, sex and breed in central Gujarat. *IJVSBT*, 17(1):23-25.
- Holumbiovskaja T. V., Stefanyk V. Y. (2018): Disorders of reproductive function in female dogs and methods of diagnostic. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. *Series: Vet. Sci.*, 20(83):385-395.
- Lecton J., Cornelius A. J., Moxon R., Russenberger J., Diel de Amorim M., Cheong S. H. (2021): Incidence and risk factors for canine mastitis and metritis in two guide dog populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 231:106802.
- Maya-Pulgarin D., Gonzalez-Dominguez M. S., Aranzazu-Taborda D., Mendoza N., Maldonado-Estrada J. G. (2017): Histopathologic findings in uteri and ovaries collected from clinically healthy dogs at elective ovariohysterectomy: a cross-sectional study. *J. Vet. Sci.*, 30;18(3):407-414.
- McEntee M. (2002): Reproductive oncology. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.*, 17:133-49.
- Münnich A., Küchenmeister U. (2014): Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: Cornerstones of practical approach. *Reprod. Domest. Anim.*, 49:64-74.
- Nagashima, J. B., Songsasen N. (2021): Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, 11(3):653.
- Ortega-Pacheco A., Gutiérrez-Blanco E., Jiménez-Coello M. (2012): Common lesions in the female reproductive tract of dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(3):547-559.
- Ortega-Pacheco A., Rodriguez-Buenfil J. C., Segura-Correa J. C., Montes de Oca-Gonzalez A. R., Jimenez-Coello M. (2006): Prevalence of fetal resorption in stray dogs in Yucatan, Mexico. *J. Small Anim. Pract.*, 47:266-9.
- Ortega-Pacheco A., Segura-Correa J.C., Jimenez-Coello M., Linde Forsberg C. (2007): Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology*, 67(2):382-90.
- Pavlović V. (2018): Maternity, sterility and artificial insemination. Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade.
- Pereira K. H. N. P., da Mata Fuchs K., Hibar V. Y., dos Santos Correia L. E. C., Ferreira J. C. P., de Souza F. F., Machado L. H. A., Chiacchio S. B., Lourenço M. L. G. (2022): Neonatal sepsis in dogs: Incidence, clinical aspects and mortality. *Theriogenology*, 177:103-115.
-

- Schlafer D. H., Miller R. B. (2007): Female genital system. In Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals, vol. 3. Eds. Maxie M. G., Saunders-Elsevier, 429-564.
- Sontas B. H., Gürbulak K., Ekici H. (2007): Síndrome de remanente ovárico en la perra: revision bibliográfica. *Arch. Med. Vet.*, 39:99-104.
- Spasojević J., Galić I., Toholj B., Stančić I., Nikolić S., Davidov I., Kukurić T., Popović N. (2022): Cryptorchidism in dogs. *Veterinary Journal Of Republic of Srpska*, 22(1-2):127-141.
- Stančić I. (2012): Reproduction of dogs and cats. Faculty of Agriculture University of Novi Sad.
- Stančić I., Galić I. (2021): Reproductive disorders in male dogs - problems of veterinarians and breeders. 32nd Conference of Serbian Veterinarians, *Proceedings and short contents*, 309-313.
- Stančić I., Stevančević M., Lako B., Jovičin M., Toholj B. (2008): The influence of breed and age on appearing of pyometra in bitches. *Vet. Glasnik*, 62(3-4):233-240.
- Stančić I., Stevančević O., Stančić J., Apić I. (2012b): Seasonal effects on appearance of pyometra in bitches. *Vet. Glasnik*, 66(1-2):143-150.
- Stančić I., Stevančević M., Toholj B., Erdeljan M., Cincović M. (2012a): Reproduction disorders and their influence on the efficiency of use in hunting bitches. International symposium on hunting, Contemporary aspects of sustainable management of game populations, *Proceedings*, 134-135.
- Switonski M., Dzimira S., Aleksiewicz R., Szczerbal I., Nowacka-Woszek J., Krzeminska P., Deska T., Nizanski W. (2018): Hypospadias is not rare in dogs: five new cases, a retrospective study, and a review of the literature. *Sexual Development*, 12(5):244-250.
- Terazono T., Inoue M., Kaedei Y., Tanihara F., Namula Z., Viet V. L., Taura Y., Takagi M., Takuma T., Otoi T. (2012): Assessment of canine ovaries autografted to various body sites. *Theriogenology*, 77:131-8.
- Veiga G. A. L., Barbosa A., D'Oliveira K. S., Brito C., Kitahara F., Frignani J. F., Pereira F. P., Carramenha C. P. (2009): Retrospective Study of Tumors at the Genital Tract of Dogs Presented at the Veterinary Hospital of Unisa During the Period of February 2000 to December 2008. World Small Animal Veterinary Association World Congress, Proceedings.
- Wallace M. S. (1991): The ovarian remnant syndrome in the bitch and queen. *Vet. Clin. North Am.*, 21:501-7.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401186U

UDK 599.723.13:502.131.1

*Pregledni naučni rad***UTICAJ EKOLOŠKIH FAKTORA NA KONSTITUCIJU MAGARACA****Milivoje UROŠEVIĆ^{1*}, Dejana ČUPIĆ MILADINOVIĆ², Panče DAMESKI³,
Igor ZDRAVEVSKI³, Ružica TRAILOVIĆ², Radomir MANDIĆ¹, Edward
MUSIWA NENGOMASHA⁴, Nikola CUKIĆ², Milena ĐORĐEVIĆ²**¹Centar za očuvanje autohtonih rasa, Beograd, Zemun, Srbija²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija³Univerzitet "Sv. Kliment Ohridski", Fakultet veterinarske medicine, Bitola, Severna
Makedonija⁴Nezavisni konsultant za proizvodnju životinja, Bulawayo, Zimbabve

*Korespondentni autor: Milivoje Urošević, milivoje.urosevic@gmail.com

Sažetak

Magarac, kao jedna od najstarijih domaćih životinja, rasprostranjen je po svim kontinentima. Organizovanih selekcijskih mera vekovima nije bilo. Osnovni uslov je bio da može dugo da hoda i nosi teret. Takvi zahtevi, a i ekološki uslovi u kojima se razvio i u kojima živi, uslovi su da magarci, bez obzira gde žive, imaju, praktično istu konstituciju tela, a ona se ogleda u indeksu koščatosti. Bez obzira na visinu grebena, odnosno veličinu tela, relativni odnosi pojedinih delova tela prilično su slični. Magarac ima snažnu konstituciju tela.

Ključne reči: Magarac, ekološki faktori, indeks koščatosti.**UVOD**

Domaći magarac (*Equus asinus*) pripada grupi najranije domestifikovanih životinja. Vodi poreklo od afričkog divljeg magarca (*Equus asinus africanus*) iz severoistočne Afrike. Postojala su tri tipa divljih magaraca i to nubijski, somalijski i magarac s planinskog masiva Atlas. Za afričkog divljeg magarca s planinskog masiva Atlas pouzdano se zna da je nestao (Urošević i sar., 2022b). Kada je reč o nubijskom divljem magarcu, za njega postoji opravdana sumnja da je nestao u slobodnoj prirodi. Pretpostavlja se da je poslednji primerak viđen u slobodnoj prirodi 1930-tih godina. Proces domestifikacije, najverovatnije, otpočeo je pre 8-11.000 godina. Taj proces se iz severne Afrike polako širio ka jugoistočnoj Aziji i jugu Evrope (Trailović i sar., 2021). I pored toga što se na osnovu istraživanja mitohondrijalne DNK (Kimura i sar., 2011) smatra da je rodonačelnik domaćeg magarca isključivo nubijski magarac, čini se da takva istraživanja treba nastaviti i produbiti, pošto određene fenotipske ekspresije domaćih magaraca ne idu, u potpunosti u prilog takvoj teoriji. Naime, nubijski magarac nema poprečno prugarste linije, kao zebra, na nogama, a somalijski ima. Osim toga

nubijski magarac ima „krst“ na leđima, a somalijski divlji magarac nema. Međutim, u praksi takva podela nije striktna, pošto postoje domaći magarci bez „krsta“ ali sa poprečnim prugama na nogama ili sa obe kombinacije. Nubijski divlji magarac visok je, u grebenu, oko 122 cm, a somalijski oko 140 cm (Urošević i sar., 2022a). Ivanković i sar. (2011) iznose mišljenje da su se, najverovatnije, ove dve podvrste divljih magaraca, nubijski (*Equus africanus africanus*) i somalijski (*Equus africanus somaliensis*) u prošlosti međusobno parile. Postoji i pretpostavka da nubijski divlji magarac potiče od somalijskog divljeg magarca. Ni ova pretpostavka ne može se, u potpunosti, odbaciti.

Smatra se da su magarci do Evrope stigli iz dva pravca. Do prostora Balkana došli su iz Male Azije. Adaptirajući se na nove klimatske uslove na Balkanu, magarci su se postepeno širili na zapad, do Italije. Tu su, zbog svojih karakteristika, postali veoma cenjeni i omiljeni. Tokom perioda širenja Rimske imperije, i magarci su, s legionarima, dospevali u druge predele i klimatske uslove. Za razliku od ovog puta ili načina dolaska u Evropu, drugi put bio je znatno kraći. Preko Gibraltarskog prolaza dospeli su u Španiju, a odatle je im bio otvoren put ka drugim zemljama.

Region gde su u prirodi živeli divlji magarci karakteriše se prilično surovim uslovima života. Hrane i vode gotovo da nikada nije bilo dovoljno. Magarci, mada su monogastrični, adaptirali su i razvili želudac kao i celokupan digestivni trakt da mogu konzumirati i iskorištavati hranu koja ima znatno više celuloze nego što je to slučaj sa drugim monogastričnim životinjama, pre svega konjima.

Ekološki uslovi

Pod ekološkim uslovima podrazumeva se skup ekoloških faktora (Stanković, 1979). Oni predstavljaju heterogeni kompleks spoljašnje sredine, koji konstantno deluje na sva živa bića. Zheleznova (2016) skup svih organizama, koji žive na određenom prostoru, podvodi pod termin agrobiocenoza.

Uticaji na životinje nastaju kao posledica aktivnosti žive i nežive prirode. Osnovna karakteristika ovakvih uticaja je neprekidnost i kompleksnost. Pojedini ekološki faktori nisu fiksni već se menjaju u vremenu i posmatranom prostoru, a često je dejstvo jednog faktora uslovljeno delovanjem drugog ekološkog faktora. Ovakav kompleksni sistem uslovljava da je nemoguće samostalno delovanje jednog faktora.

Intenzitet uticaja kompleksa ekoloških faktora konstantno je promenljiv, ali nikada ne prestaje. Kada se posmatra jedna populacija, pre svega mikropopulacija neke životinjske vrste, uočljivo je da pripadnici tog dela populacije imaju relativno ograničen životni prostor. Taj deo životnog prostora naziva se ekološka niša. Kako navodi Stanković (1979), pod tim pojmom se podrazumeva skup svih ekoloških valenci jedne organske vrste. To su granice koje agrobiocenoza može, uz toleranciju, da podnese bez štetnih posledica, na mestu koje naseljava.

Da bi određena vrsta opstala u određenim uslovima, ona mora biti maksimalno adaptirana. Završetku procesa adaptacije prethodio je dug proces modifikacije. Efekti

modifikacije, u cilju adaptacije, su različiti i vidljivi. Furtunescu (1958) navodi da postoje dve osnovne grupe modifikacije: morfološka i fiziološka modifikacija.

Za morfološke modifikacije je karakteristično da u ovom kompleksu modifikacionih promena dolazi do značajnih promena dimenzija (veličine) i mase tela. Zatim promene uslovljavaju i izmene u konformaciji tela. Dolazi do izmena u obliku i veličini glave, formi tela i snazi kostiju. U morfološke modifikacije spadaju i promene u građi skeleta. U zavisnosti gde životinje žive i kako obavljaju rad, javljaju se duže ili kraće kosti, odnosno više ili niže telo životinje. U grupu morfoloških modifikacija spada i promena boje dlačnog pokrivača. Postoji mogućnost da izostane pigment (albinizam). Moguće je da pigmenta nema u dlaci, već samo u koži (leucizam). Kod intenzivnog tamnog, crnog pigmenta, reč je o melanizmu, a ako su prisutne druge obojenosti onda se govori o flavizmu. U kompleks morfoloških modifikacija dolaze i morfološko-fiziološke promene muskulature. Očigledni su primer životinja za rad (magarac) i tovne životinje. Ove promene očigledne su, primera radi, kod goveda selekcioniranih za proizvodnju mleka i onih za proizvodnju mesa.

Fiziološke modifikacije su neophodne da bi se određena životinjska vrsta prilagodila na postojeće uslove života. Tipičan primer su magarci. Ove životinje doživele su značajne fiziološke modifikacije u vrsti hrane koju konzumiraju, a i u količini vode koju mogu izgubiti, bez posledica, iz organizma, kao i način na koji nadoknađuju izgubljenu vodu. Značajne fiziološke modifikacije desile su se u genitalnom aparatu i sistemu reprodukcije. Sezona parenja je tako biološki organizovana, da se mladunci rađaju u vreme kada ima najviše hrane. Kod magaraca nije karakteristično da majka na svet donosi više mladunčadi, za razliku od nekih drugih životinja. To je posledica adaptiranja na uslove života, koji ne nude dovoljno hrane za više mladunčadi.

Aklimatizacija

Danas su magarci rasprostranjeni na svim kontinentima, ima ih u svim predelima i regionima (osim predela večitog leda). To je posledica uspešnog procesa aklimatizacije magaraca. Proces aklimatizacije, odnosno njena uspešnost, različito je izražena kod različitih vrsta, rasa, sojeva, a osim toga postoje i unutar rasne razlike (Nikolić i Simović, 1980). Ovo uslovljava bržu ili sporiju aklimatizaciju, a to zavisi, pre svega, od naslednih osobina, konformacije tela, konstitucije i zdravstvenog stanja. Veoma su bitne razlike u klimatskim uslovima i njihov uticaj na organizam.

Magarci potiču iz toplih, aridnih regiona. Proces modifikacije su omogućili njihov opstanak u takvim krajevima. Često se postavlja pitanje kako su magarci uspeli da se aklimatizuju na tako širok spektar klimatskih uslova.

Kada je reč o aklimatizaciji, potuno logično je da su problemi mnogo manji i ređi ako se radi o sličnim regionima iz kojih životinje izlaze i u koji dolaze. Najmanje problema postoji kod aklimatizacije ako se životinje prenose (presele) po izotermičkoj liniji. Aklimatizacija je lakša ako životinje dolaze iz toplijih i suvih krajeva u vlažnije i manje tople. Upravo takva situacija je sa magarcima. Oni su se veoma dobro aklimatizovali na nove uslove, koji se drastično razlikuju od onih gde su nastali.

Процес аклиматизације траје дуго, а трајна аклиматизација може се постићи тек после 3-4 генерације (Николић и Симовић, 1980).

Конституција

Појам конституција користио се у хуманој медицини још у доба Хипократа (cca 460-380. године п.н.е.). За разлику од хумане медицине, конституција се, у зоотехници, као појам појављује тек крајем 19. века (Зиго и сар., 2016). Под тим појмом подразумева се skup особина које су наследне и стећене, затим ту припадају физиолошке особине као и отпорност на утицај фактора спољашње средине.

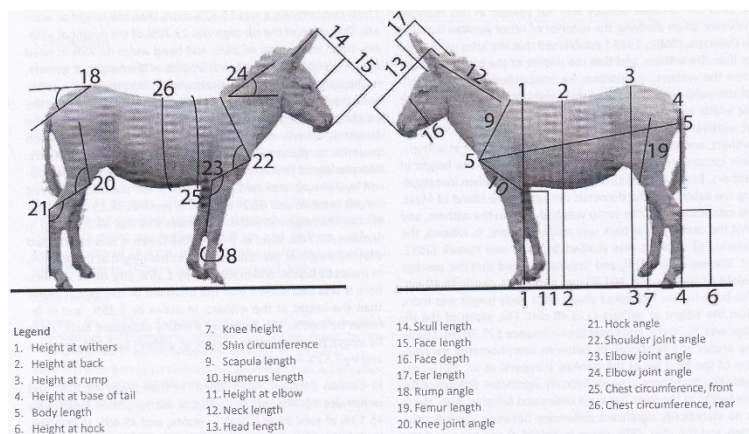
Конституција обухвата све особине (морфолошке, физиолошке, биохемијске и функционалне карактеристике) које утичу и омогућавају виталност, издржљивост и продуктивност јединке. У зависности од развијености јединки, постоје различити типови конституције. За магарце је карактеристична снажна конституција.

Процена конституције обавља се на два начина (Creta и сар., 1995):

- Somatoscopia: ово је брзи начин процене конституције пошто се животиња визуелно посматра и на основу виђеног изводе закључци и
- Somatometria: ово је најпouzданiji начин процене и утврђивања конституције, пошто се обавља утврђивање морфолошких параметара на телу посматране животиње.

Телесни индекси

На основу добијених апсолутних вредности појединих морфометријских параметара није могуће обавити поређење, односно извођење закључка о појединим односима и утврђивању типа конституције. Због тога се користе индекси, а они представљају процентуалан однос једне мере према некој другој. Индекси се израчунавају за оне мере које својим међусобним односима најбоље изражавају одређене односе, тј. пропорције тела. Они најбоље одражавају телесну грађу (Панић, 1985).



Slika 1 Utvrđivanje vrednosti pojedinih morfoloških parametara na telu magarca (Urošević i sar., 2019b)

Na osnovu dobijenih vrednosti pojedinih telesnih indeksa, moguće je obaviti procenu i izvesti zaključak o nivou razvoja i tipu konstitucije posmatrane životinje.

Za definisanje određenog tipa konstitucije najpouzdaniji je indeks koščatosti. Za izračunavanje ovog indeksa neophodno je utvrditi obim cevanice i visinu grebena. Apsolutna vrednost za obim cevanice podeli se sa apsolutnom vrednošću visine grebena i pomnoži sa 100.

Kada se posmatra fenotip magarca (somatoscopia) oni su prilično heterogena vrsta. Misli se, pre svega na visinu grebena. Postoje magarci čija visina grebena ne doseže ni 90 cm, dok sa druge strane postoje oni čija visina grebena iznosi i 150 cm. Ako se posmatra samo visina grebena, oni su, zaista, izuzetno različiti.

Magarac je domaća životinja koja vekovima nije bila podvrgavana nikakvim selekcijskim merama. Sve što se stvaralo nastalo je kao rezultat prirodne selekcije, odnosno adaptacije na postojeće uslove i potrebe. Osnovna potreba bila je rad. Bez obzira na klimatske uslove i geografske regione, magarac je bio isključivo radna životinja. Takva potreba profilisala je i uslovila stvaranje snažne životinje, a to je uslovalo nastanak snažne konstitucije. Bez obzira gde se nalaze, magarci imaju snažnu konstituciju i gotovo isti biostatički model građe tela. Takav biostatički model omogućava maksimalnu produkciju biokinetičke energije, koja izaziva biokinematički efekat koji nazivamo kretanje.

Snažna konstitucija ogleda se u vrednosti indeksa koščatosti. Urošević i sar. (2019b) u populaciji belog baroknog magarca u Austriji utvrdili su prosečan obim cevanice od 14,00 cm i prosečnu visinu grebena od 115,50 cm. Tu je indeks koščatosti iznosio 12,12. Kada je reč o obimu cevanice magaraca na otoku Rabu (Hrvatska), Urošević i sar. (2019a) utvrdili su prosečnu vrednost kod muških jedinki od 13,30 cm i ženki 13,20 cm, a prosečna visina grebena bila je 100,80 cm za mužjake i 95,40 cm za ženke. Indeks koščatosti mužjaka bio je 13,90, a ženki 13,83.

Još 1938. godine Babić (1938) je, utvrđujući eksterijerne karakteristike napuljskih magaraca uvezenih u Dalmaciju (Hrvatska), utvrdio da je visina grebena priplodnjaka, u proseku, iznosila 128,80 cm, a obim cevanice u proseku 16,30 cm. U tom slučaju indeks koščatosti iznosio je 12,65.

Na prilično velikom uzorku od 147 pastuva, 62 kastrata i 240 magarica, ukupno 449 jedinki, na otoku Mljetu (Hrvatska), Essert (1959) je utvrdio da je ukupni prosek vrednosti obima cevanice 12,20 cm, a visine grebena 100,00 cm. Na osnovu toga prosečna vrednost indeksa koščatosti bila je 12,20.

Proučavajući zemaljski uzgoj magaraca u Austriji, Urošević i sar. (2022a) utvrdili su da se obim cevanice nalazi u rasponu od 12 do 16 cm uz visinu grebena od 99,60 do 140,60 cm. U ovoj populaciji indeks koščatosti nije se mnogo razlikovao unutar populacije. Razlike u visini grebena bile su 37,3%, a razlike u indeksu koščatosti 26,99%.

Ivanković i sar. (2000) utvrdili su da prosečna vrednost obima cevanice kod primorsko-dinarskog tipa magaraca iznosi 12,82 cm, a visina grebena 96,93 cm. Na osnovu toga indeks koščatosti je 13,26. Kod severno-jadranskog tipa magaraca ovi autori su utvrdili prosečnu visinu grebena od 115,28 cm i obim cevanice od 14,85 cm. U tom slučaju indeks koščatosti je 12,88. Kod istarskog magarca ovi autori su utvrdili prosečnu visinu grebena od 124,07 cm i obim cevanice od 16,30 cm, što uslovljava indeks koščatosti od 13,14.

Na imponantnom uzorku od 123 muška grla i 200 ženki magaraca u severozapadnom regionu Etiopije, Mustefa i sar. (2020) utvrdili su da se obim cevanice kreće u granicama od 20,00 do 29,00 cm uz istovremenu visinu grebena od 79,00 do 119,00 cm. Na osnovu tih rezultata proizlazi da se indeks koščatosti kretao u intervalu od 24,37 do 25,32. Mora se priznati da ovakve vrednosti prilično odudaraju od mnogobrojnih literaturnih podataka o indeksu koščatosti. Očigledno je da magarci u regionu Benishangul Gumuz imaju prilično snažan kostur.

Ispitujući morfološke karakteristike magaraca rase amiata, Sargentini i sar. (2018) su u četiri grupe proučavanih magaraca ove rase utvrdili da se obim cevanice kretao od 16,30 do 17,60 cm. Gde je registrovana najmanja vrednost obima utvrđena je srednja vrednost visine grebena od 123,20 cm, a uz najveći obim cevanice visina grebena bila je 130,70 cm. Na osnovu tih rezultata sledi da je indeks koščatosti bio u intervalu od 13,23 do 13,46.

ZAKLJUČAK

Na osnovu podataka o indeksu koščatosti magaraca u različim klimatskim uslovima nameće se zaključak da su svi rezultati, osim onih o magarcima u Etiopiji, prilično homogeni. To je potpuno logično jer bez obzira na veličinu tela, odnosno visinu grebena, ako obavljaju isti ili veoma sličan rad, to zahteva približno istu konstituciju tela, odnosno približno isti indeks koščatosti. Ovo je rezultat selekcije koja je imala, isključivo za cilj, odabir najpovoljnijih jedinki za dugo hodaње i nošenje tereta. Slični radni zahtevi uslovljavaju postojanje sličnog biostatističkog modela tela magaraca.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Babić E. (1938): Prilog poznavanju napuljskih magaraca u Dalmaciji. *Veterinarski arhiv*, 9(4):228-252.
- Creta V., Morar R., Culea C. (1995): Zootehnie generală și specială. Editura Didactică și Pedagogică București.
- Essert Z. (1959): Domaći magarac otoka Mljeta. *Veterinaria*, 1:41-54.
- Furtunescu A. (1958): Zootehnie generala, Vol. I. Ministerul Agriculturii și Silviculturii Editura Agro-Silvică de Stat.
- Ivanković A., Caput P., Mioč B., Pavić V. (2000): The Phenotype Features of Donkeys in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 65(2):99-105.
-

- Ivanković A., Ramljak J., Korabi N., Antolović M., Škutin M. H., Šubara G., Orlić B., Romano F., Gordan G., Pauletić M. (2011): Uzgojni program istarskog magarca. Istarska županija.
- Kimura B., Marshal F., Chen S., Rosenbom S., Moehlman P., Tuross N., Sabin R. C., Peters J., Barich B., Yohannes H., Kebede F., Teclai R., Beja Pereira A., Mulligan C. J. (2011): Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insight into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 278(1702):50-57.
- Mustefa A., Assefa A., Misganaw M., Getachew F., Abegaz S., Hailu A., Emshaw Y. (2020): Phenotypic characterization of Donkeys in Benishangul Gumuz National regional State. *Online J. Anim. Feed Res.*, 10(1):25-35.
- Nikolić D., Simović B. (1980): Opšte stočarstvo. Naučna knjiga.
- Panić M. (1985): Biološke osnove stočarstva-praktikum. Poljoprivredni fakultet Zemun.
- Sargentini C., Tocci R., Martini A., Bozzi R. (2018): Morphological characterization of Amiata donkey through Multivariate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47:e201709310:1-10.
- Stanković S. (1979): Ekologija životinja. Zavod za izdavanje udžbenika Socijalističke Republike Srbije.
- Trailović D., Trailović R., Urošević M., Trailović I. (2021): Uzgoj, nega i bolesti magaraca. Centar za očuvanje autohtonih rasa – COAR.
- Urošević M., Drobnjak D., Fury M., Stojić P., Stanišić G. (2019a): Eksterijerni parametri tela primorsko-dinarskog magarca sa ostrva Rab. 33. Savetovanje agronoma, veterinara i agroekonomista. Zbornik naučnih radova, 25(3-4):55-60.
- Urošević M., Nemecek M., Drobnjak D., Gangl A., Dameski P., Stojić P., Stanisic G. (2019b): Morphological Characterization of the White Baroque Donkey. *Animal Health Prod. and Hyg.*, 8(1):627-633.
- Urošević M., Drobnjak D., Vlaeva R., Stanišić G., Mandić R., Grittner N., Dameski P. (2022a): Correlation of morphological parameters of donkey from Austria. *Veterinarska stanica*, 53(2):185-199.
- Urošević M., Mandić R., Trailović R., Trailović D., Namsraijav T., Stanišić G. (2022b): Divlji magarci. Centar za očuvanje autohtonih rasa.
- Zheleznova T. K. (2016): Agroecological Dictionary. Russian state agrarian university K. A. Timiryazev.
- Zigo F., Vasil M., Lackova Z., Pavlak A. (2016): Cvičenia zo všeobecnej zootechniky. Univerzita Veterinarskeho lekarstva a farmacie v Košicas, Ustav chovu zvierat.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401193U

UDK 599.723.13:502.131.1

Review Scientific Paper

THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE CONSTITUTION OF DONKEYS

Milivoje UROŠEVIĆ^{1*}, Dejana ČUPIĆ MILADINOVIĆ², Panče DAMESKI³,
Igor ZDRAVEVSKI³, Ružica TRAILOVIĆ², Radomir MANDIĆ¹, Edward
MUSIWA NENGOMASHA⁴, Nikola CUKIĆ², Milena ĐORĐEVIĆ²

¹Center for preservation of indigenous breeds, Belgrade, Zemun, Serbia

²University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

³St. Clement of Ohrid University of Bitola, Faculty of Veterinary Medicine, Bitola, North Macedonia

⁴Independent Animal Production Consultant, Bulawayo, Zimbabwe

*Corresponding author: Milivoje Urošević, milivoje.urosevic@gmail.com

Summary

The donkey, as one of the oldest domestic animals, is spread over all continents. There were no organized selection measures for centuries. The basic condition was that the donkey could walk for a long time and carry a load. Such requirements, as well as the ecological conditions in which they developed and live, caused donkeys, regardless of where they live, to have practically the same body constitution, which is reflected in the bony index. Regardless of the height of the withers, that is, the size of the body, the relative relationships of individual parts of the body are quite similar. The donkey has a strong body constitution.

Key words: donkey, ecological factors, bony index.

INTRODUCTION

The domestic donkey (*Equus asinus*) belongs to the group of the earliest domesticated animals. It originates from the African wild donkey (*Equus asinus africanus*) from northeastern Africa. There were three types of wild donkeys: Nubian, Somali and the Atlas mountain donkey. The African wild donkey from the Atlas mountain massif is reliably known to have disappeared (Urošević et al., 2022b). When it comes to the Nubian wild donkey, there is a justified suspicion that it has disappeared in the wild nature. It is assumed that the last specimen was seen in the wild nature in the 1930s. The domestication process, most likely, began 8-11,000 years ago. This process slowly spread from North Africa to Southeast Asia and southern Europe (Trailović et al., 2021). Despite the fact that, on the basis of mitochondrial DNA research (Kimura et al., 2011), it is considered that the progenitor of the domestic donkey is exclusively the Nubian donkey, it seems that such research should be continued and deepened, since

certain phenotypic expressions of domestic donkeys do not fully support such a theory. Namely, the Nubian donkey does not have cross-striped lines, like a zebra, on its legs, while the Somali donkey does. In addition, the Nubian donkey has a "cross" on its back, while the Somali wild donkey does not. However, in practice, such division is not strict, since there are domestic donkeys without a "cross" but with transverse stripes on the legs or with both combinations. The Nubian wild donkey is about 122 cm tall at the withers, and the Somali wild donkey is about 140 cm (Urošević et al., 2022a). Ivanković et al. (2011) state the opinion that, most likely, these two subspecies of wild donkeys, Nubian (*Equus africanus africanus*) and Somali (*Equus africanus somaliensis*), mated with each other in the past. There is also an assumption that the Nubian wild donkey originates from the Somali wild donkey. This assumption cannot be completely rejected either.

It is believed that donkeys reached Europe from two directions. They came to the Balkans from Asia Minor. Adapting to the new climatic conditions in the Balkans, donkeys gradually spread to the west, to Italy. There, due to their characteristics, they became highly valued and loved. During the period of the expansion of the Roman Empire, the donkeys, along with the legionnaires, reached other regions and climatic conditions. Unlike this route or way of arriving in Europe, the second route was significantly shorter. They reached Spain through the Strait of Gibraltar, and from there the way to other countries was open to them.

The region where wild donkeys lived in nature is characterized by rather harsh living conditions. There was almost never enough food and water. Donkeys, although they are monogastric, have adapted and developed their stomach and entire digestive tract to be able to consume and use food that has significantly more cellulose than is the case with other monogastric animals, primarily horses.

Ecological conditions

Ecological conditions mean a set of ecological factors (Stanković, 1979). They represent a heterogeneous complex of the external environment, which constantly acts on all living beings. Zheleznova (2016) states that the term agrobiocenosis represents a set of all organisms that live in a certain area.

Impacts on animals occur as a result of the activities of living and non-living nature. The basic characteristic of such influences is continuity and complexity. Some environmental factors are not fixed but change in time and observed space, and often the effect of one factor is conditioned by the effect of another environmental factor. Such a complex system means that the independent action of one factor is impossible. The intensity of the influence of the complex of environmental factors is constantly changing, but it never stops. When one population is observed, primarily a micropopulation of an animal species, it is noticeable that the members of that part of the population have a relatively limited living space. That part of the living space is called an ecological niche. According to Stanković (1979), this term means the set of all ecological valences of one organic species. These are the limits that the

agrobiocenosis can bear, with tolerance, without harmful consequences, in the place it inhabits.

In order for a certain species to survive in certain conditions, it must be maximally adapted. The end of the adaptation process was preceded by a long modification process. The effects of modification, with the aim of adaptation, are different and visible. Furtunescu (1958) states that there are two basic groups of modification: morphological and physiological modification.

It is characteristic of morphological modifications that there are significant changes in the dimensions (size) and mass of the body. Then the changes provoke the changes in the conformation of the body. There are changes in the shape and size of the head, the shape of the body and the strength of the bones. Morphological modifications also include changes in the structure of the skeleton. Depending on where the animals live and how they perform their work, longer or shorter bones appear, that is, the animal's body is taller or shorter. The group of morphological modifications also includes a change in the color of the hair cover. There is a possibility that the pigment is absent (albinism). It is possible that there is no pigment in the hair, but only in the skin (leucism). With intense dark, black pigment, it is melanism, and if other colors are present, then it is flavism. Morphological-physiological changes in the musculature are also included in the complex of morphological modifications. Obvious examples are working animals (donkey) and fattening animals. These changes are evident, for example, in cattle selected for milk production and those for meat production.

Physiological modifications are necessary in order for a certain animal species to adapt to the existing living conditions. Donkeys are a typical example. These animals experienced significant physiological modifications in the type of food they consume, and in the amount of water they can lose, without consequences, from the body, as well as the way they compensate for lost water. Significant physiological modifications occurred in the genital apparatus and reproductive system. The mating season is so biologically organized that cubs are born at the time when there is the most food. It is not characteristic of donkeys that the mother gives birth to more cubs, unlike some other animals. This is a consequence of adapting to living conditions, which do not offer enough food for more cubs.

Acclimatization

Today, donkeys are spread on all continents, they are found in all areas and regions (except for areas of permafrost). This is a consequence of the successful acclimatization process of the donkeys. The process of acclimatization, i.e. its success, is expressed differently in different species, races, strains, and in addition, there are also racial differences (Nikolić and Simović, 1980). This leads to faster or slower acclimatization, which depends, first of all, on hereditary traits, body conformation, constitution and health status. Differences in climatic conditions and their impact on the organism are very important.

Donkeys come from warm, arid regions. Modification processes have enabled their survival in such regions. The question is often asked, how did the donkeys manage to acclimatize to such a wide range of climatic conditions.

When it comes to acclimatization, it is completely logical that the problems are much smaller and rarer if it is about similar regions from which the animals leave and to which they arrive. Acclimatization has the fewest problems if the animals are transported (moved) along an isothermal line. Acclimatization is easier if animals come from warmer and drier regions to wetter and less warm ones. This is exactly the situation with donkeys. They have acclimatized very well to the new conditions, which are drastically different from those where they were born.

The acclimatization process takes a long time, and permanent acclimatization can only be achieved after 3-4 generations (Nikolić and Simović, 1980).

Constitution

The term constitution was used in human medicine as early as the time of Hippocrates (approx. 460-380 BC). In contrast to humane medicine, constitution, in zootechnics, as a term appeared at the end of the 19th century (Zigo et al., 2016). This term means a set of characteristics that are hereditary and acquired, then it includes physiological characteristics as well as resistance to the influence of external environmental factors. The constitution includes all features (morphological, physiological, biochemical and functional characteristics) that influence and enable the vitality, endurance and productivity of an individual. Depending on the development of individuals, there are different types of constitution. Donkeys are characterized by a strong constitution.

The constitution is assessed in two ways (Creta et al., 1995):

- Somatoscopy: this is a quick way to assess the constitution, since the animal is visually observed and based on what is seen, conclusions are drawn and
- Somatometry: this is the most reliable way to assess and determine the constitution, since the morphological parameters are determined on the body of the observed animal.

Body mass index

Based on the obtained absolute values of individual morphometric parameters, it is not possible to make a comparison, that is, to draw a conclusion about certain relationships and determine the type of constitution. This is why indexes are used, and they represent the percentage ratio of one measure to another. Indices are calculated for those measures that best express certain relationships with their mutual relations, i.e. body proportions. They best reflect body composition (Panić, 1985).

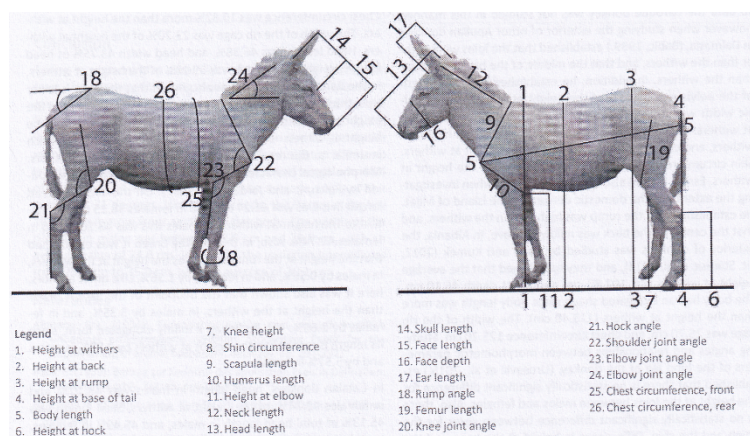


Figure 1 Determination of certain morphological parameters on the body of a donkey (Urošević et al., 2019b)

Based on the obtained values of certain body indices, it is possible to make an assessment and draw a conclusion about the level of development and type of constitution of the observed animal.

For defining a certain type of constitution, the bony index is the most reliable. To calculate this index, it is necessary to determine the circumference of the shin and the height of the crest. The absolute value for the shin circumference is divided by the absolute value of the height of the withers and multiplied by 100.

When looking at the donkey phenotype (somatoscopy), they are quite a heterogeneous species. This applies primarily to the height of the ridge. There are donkeys whose withers do not even reach 90 cm, while on the other hand there are those whose withers are as high as 150 cm. If only the height of the crests is observed, they are, indeed, extremely different.

The donkey is a domestic animal that has not been subjected to any selection measures for centuries. Everything that was created was the result of natural selection, that is, adaptation to existing conditions and needs. The basic need was work. Regardless of the climatic conditions and geographical regions, the donkey was exclusively a working animal. Such a need shaped and conditioned the creation of a strong animal, which conditioned the creation of a strong constitution. Regardless of where they are, donkeys have a strong constitution and almost the same biostatic model of body structure. Such a biostatic model enables maximum production of biokinetic energy, which causes the biokinematic effect we call movement.

A strong constitution is reflected in the value of the bony index. Urošević et al. (2019b) in the population of the white baroque donkey in Austria determined an average circumference of the shin of 14.00 cm and an average height of the withers of 115.50 cm. The bony index was 12.12. When it comes to the girth of donkeys on the island of Rab (Croatia), Urošević et al. (2019a) found an average value of 13.30 cm for males

and 13.20 cm for females, and the average height of the withers was 100.80 cm for males and 95.40 cm for females. The ossity index of males was 13.90, and of females 13.83.

Back in 1938, Babić (1938), while determining the exterior characteristics of Neapolitan donkeys imported to Dalmatia (Croatia), determined that the height of the withers of the breeding stock was, on average, 128.80 cm, and the circumference of the shin was 16.30 cm on average. In that case, the bony index was 12.65.

On a fairly large sample of 147 stallions, 62 geldings and 240 donkeys, a total of 449 individuals, on the island of Mljet (Croatia), Essert (1959) determined that the overall average value of the tibia circumference was 12.20 cm and the height at the withers was 100.00 cm. Based on this, the average value of the bone index was 12.20.

Studying the land breeding of donkeys in Austria, Urošević et al. (2022a) determined that the circumference of the tibia is in the range of 12 to 16 cm with the height of the ridge from 99.60 to 140.60 cm. In this population, the ossification index did not differ much within the population. The differences in the height of the withers were 37.3%, and the differences in the bony index were 26.99%.

Ivanković et al. (2000) determined that the average value of the circumference of the shin in the Primorsko-Dinaric type of donkeys is 12.82 cm, and the height of the withers is 96.93 cm. Based on this, the bony index is 13.26. In the North Adriatic type of donkeys, these authors determined an average height of the withers of 115.28 cm and a circumference of the shin of 14.85 cm. In this case, the bony index is 12.88. In the case of the Istrian donkey, these authors determined an average height of the withers of 124.07 cm and the circumference of the tibia of 16.30 cm, which determines the bony index of 13.14.

In an impressive sample of 123 male donkeys and 200 female donkeys in the northwestern region of Ethiopia, Mustefa et al. (2020) determined that the circumference of the tibia ranges from 20.00 to 29.00 cm with a simultaneous ridge height of 79.00 to 119.00 cm. Based on these results, it follows that the bony index ranged from 24.37 to 25.32. It must be admitted that these values deviate quite a lot from numerous literature data on the bony index. It is obvious that the donkeys in the Benishangul Gumuz region have quite a strong skeleton.

Examining the morphological characteristics of amiata donkeys, Sargentini et al. (2018) found that the circumference of the tibia ranged from 16.30 to 17.60 cm in four groups of donkeys of this breed. Where the smallest girth value was registered, the mean value of the crest height was determined to be 123.20 cm, and with the largest shin circumference, the crest height was 130.70 cm. Based on these results, it follows that the ossification index was in the interval from 13.23 to 13.46.

CONCLUSION

Based on the data on the bone density index of donkeys in different climatic conditions, the conclusion is that all the results, except for those on donkeys in Ethiopia, are quite homogeneous. This is completely logical because regardless of body size, i.e. the

height of the withers, if donkeys perform the same or very similar work, it requires approximately the same body constitution, i.e. approximately the same bony index. This is the result of a selection that had the sole aim of selecting the most suitable individuals for long walks and carrying loads. Similar work requires the existence of a similar biostatic model of the donkey's body.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Babić E. (1938): A contribution to the knowledge of Neapolitan donkeys in Dalmatia. *Veterinarski arhiv*, 9(4):228-252.
- Creta V., Morar R., Culea C. (1995): Zootehnie generală și specială. Editura Didactică și Pedagogică București.
- Essert Z. (1959): Domestic donkey of the island of Mljet. *Veterinaria*, 1:41-54.
- Furtunescu A. (1958): Zootehnie generala, Vol. I. Ministerul Agriculturii și Silviculturii Editura Agro-Silvică de Stat.
- Ivanković A., Caput P., Mioč B., Pavić V. (2000): The Phenotype Features of Donkeys in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 65(2):99-105.
- Ivanković A., Ramljak J., Korabi N., Antolović M., Škutin M. H., Šubara G., Orlić B., Romano F., Gordan G., Pauletić M. (2011): Breeding program of the Istrian donkey. Istria County.
- Kimura B., Marshal F., Chen S., Rosenbom S., Mochlman P., Tuross N., Sabin R. C., Peters J., Barich B., Yohannes H., Kebede F., Teclai R., Beja Pereira A., Mulligan C. J. (2011): Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insight into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 278(1702):50-57.
- Mustefa A., Assefa A., Misganaw M., Getachew F., Abegaz S., Hailu A., Emshaw Y. (2020): Phenotypic characterization of Donkeys in Benishangul Gumuz National regional State. *Online J. Anim. Feed Res.*, 10(1):25-35.
- Nikolić D., Simović B. (1980): General animal husbandry. Naučna knjiga.
- Panić M. (1985): Biological basics of animal husbandry - practical course. Agricultural Faculty Zemun.
- Sargentini C., Tocci R., Martini A., Bozzi R. (2018): Morphological characterization of Amiata donkey through Multivariate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47:e201709310:1-10.
- Stanković S. (1979): Animal ecology. Institute for publishing textbooks of the Socialist Republic of Serbia.
- Trailović D., Trailović R., Urošević M., Trailović I. (2021): Breeding, care and diseases of donkeys. Center for preservation of indigenous breeds – CEPIB.
- Urošević M., Drobnjak D., Fury M., Stojić P., Stanišić G. (2019a): Body exterior parameters of the coastal-Dinaric donkey from the island of Rab. 33. Conference

of Agronomists, Veterinarians, Technologists and Agricultural Economists. *Proceedings*, 25(3-4):55-60.

Urošević M., Nemecek M., Drobnjak D., Gangl A., Dameski P., Stojić P., Stanisic G. (2019b): Morphological Characterization of the White Baroque Donkey. *Animal Health Prod. and Hyg.*, 8(1):627-633.

Urošević M., Drobnjak D., Vlaeva R., Stanišić G., Mandić R., Grittner N., Dameski P. (2022a): Correlation of morphological parameters of donkey from Austria. *Veterinarska stanica*, 53(2):185-199.

Urošević M., Mandić R., Trailović R., Trailović D., Namsrajav T., Stanišić G. (2022b): Wild donkeys. Center for preservation of indigenous breeds.

Zheleznova T. K. (2016): Agroecological Dictionary. Russian state agrarian university K. A. Timiryazev.

Zigo F., Vasil M., Lackova Z., Pavlak A. (2016): Cvičenia zo všeobecnej zootechniky. Univerzita Veterinarskeho lekarstva a farmacie v Košicas, Ustav chovu zvierat.

DOI 10.7251/VETJSR2401201G

UDK 636.7.09:[616.98:578.825

Оригинални научни рад

АУЈЕСКИЈЕВА БОЛЕСТ КОД ЛОВАЧКОГ ПСА НА ТЕРИТОРИЈИ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

Срђан Глигорић^{1*}, Драган Кнежевић¹, Драган Касагић¹, Димитрије Глишић², Дарко Маринковић³

¹Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Босна и Херцеговина

²Научни институт за ветеринарство Србије, Београд, Србија

³Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Срђан Глигорић, srdjan.gligoric@virs-vb.com

Сажетак

Аујескијева болест (лажно бјеснило) је акутно, контагиозно, вирусно обољење, прије свега свиња, а затим и других врста домаћих и дивљих животиња, које изазива херпесвирус свиња тип 1. Код свиња зараза је ензоотског карактера, са високом стопом леталитета при првом уласку вируса у запате и карактерише се енцефалитисом и високом стопом морталитета код прасади, пнеумонијом код старијих и абортусима код супрасних крмача. Обољење се код секундарних домаћина јавља спорадично и праћено је кратким инкубационим периодом и фаталним исходом. Карнивори се заразе у директном или индиректном контакту са свињама и ингестијом сировог или термички недовољног обрађеног меса и унутрашњих органа, а код њих се карактерише неуролошким поремећајима у виду пруритуса до аутомутилације.

У раду је описан случај Аујескијеве болести на територији града Теслић у 2024. години, код ловачког пса расе Плот, који је током лова дошао у директан физички контакт са дивљом свињом, као и лешом одстрељене животиње. Иницијални знаци болести су се појавили након 24 часа у виду инапетенце, фебре и повраћања. Након иницијалних знакова, уследили су неуролошки поремећаји испољени у виду нагињања главе на страну, хиперсаливације и пруритуса, који је прогредирао до аутомутилације у предјелу главе. Угинуће је уследило након 36 часова од појаве неуролошких поремећаја. Макроскопским прегледом су уочене лезије на кожи главе и врата, хиперемија конјунктива, генерализована лимфаденопатија, хиперемија плућа, можданица и мозга. Установљена је и дилатација желуца са торзијом слезине на десно, највјероватније као последица акутног шока и бола. Хистопатолошким анализом утврђен је негнојни менингоенцефалитис који се карактерисао дискретним периваскуларним моноклеарним инфилтратом и периваскуларним крвављењима у великом мозгу, те глиозом, сателитозом и неуронофагијом у продуженој мождини, као и

налазом интрануклеарних еозинофилних инклузија у неуронима продужене мождине. Резултати молекуларне анализе можданог ткива и ткива из лезија коже, применом qPCR методе доказали су присуство нуклеинске киселине херпесвируса свиња тип 1 у испитиваним узорцима.

Спорадично инфицирање ловачких паса може да указује на циркулацију вируса у популацији дивљих свиња у Републици Српској.

Кључне ријечи: Аујескијева болест, херпес вирус свиња тип 1, ловачки пас, негнојни менингоенцефалитис.

УВОД

Аујескијева болест (лажно бјеснило) је акутно, контагиозно, вирусно обољење прије свега свиња, а затим и других врста домаћих и дивљих животиња. Узрочник је херпесвирус свиња тип 1 (*Suid herpesvirus 1*), ДНК вирус из рода *Varicellovirus*, из подфамилије *Alphaherpesvirinae*, а које обухвата фамилија *Herpesviridae* (WOAH, 2018). Аујескијева болест нема зоонозни потенцијал (CFSPH, 2017). Због изразитог потенцијала да изазове инфекцију нервног ткива, а с друге стране због његових септикемично-висцеротропних патолошких ефеката на другим органским системима, дефинише се као пантропан вирус са израженим неуротропизмом (Софреновић и Кнежевић, 1994). Код свиња зараза је ензоотског карактера, са високом стопом леталитета при првом уласку вируса у запате. Испољавање клиничких знакова болести код свиња зависи прије свега од старости животиње, а затим од имунолошког статуса, менаџмента на фарми и вируленције узрочника. Обољење се код свиња карактерише енцефалитисом и високом стопом морталитета код прасади, пнеумонијом код старијих и абортусима код супрасних крмача (Pejsak и Truszczyński, 2006; Koshemetov и сар., 2021). Међутим, код домаћих и дивљих свиња неријетко може да се развије латентна инфекција са локализацијом вируса у нервним ганглијама. На тај начин стварају се услови за активно или пасивно клицоноштво, те домаће и дивље свиње представљају резервоар вируса за секундарне домаћине (најчешће овце, говеда, карниворе) (Milicevic и сар., 2016; Sehl и Teifke, 2020). Код секундарних домаћина обољење се јавља спорадично, карактерише се кратким инкубационим периодом и фаталним исходом. Овце и говеда се заразе у кохабитацији са свињама (Deblanc и сар., 2019; Ciarello и сар., 2022). Карнивори се заразе у директном или индиректном контакту са свињама, или ингестијом сировог или термички недовољно обрађеног меса и унутрашњих органа. Након иницијалних, неспецифичних знакова болести, јављају се знаци неуролошких поремећаја у виду пруритуса који може да прогредира до аутомутилације. Пруритус је код секундарних домаћина манифестација тригеминалног ганглионеуритиса, инфекције ганглија дорзалног коријена и паравертебралних ганглија. Свиње не испољавају знаке пруритуса (Laval и Enquist, 2020).

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Обдукција пса извршена је 2024. године, са сумњом да је до угинућа дошло услед Аујескијеве болести. Материјал за обдукцију је леш угинулог ловачког пса расе Плот са територије града Теслић, старости 19 мјесеци, интактна куја, у добром кондиционом стању. Након извршене обдукције, за хистопатолошку анализу узоркована су ткива мозга и продужене мождине, лимфних чворова, јетре и плућа. Након фиксације у 10% неутралном пуферизованом формалину, ткива су дехидрирана у серији алкохола, просвијетљена у ксилолу и након импрегнирања у течном парафину укалупљена у парафинске калупе. Исјечци ткива дебљине 3-5 μm су обојени хематоксилином и еозином.

Дио узорка ткива мозга је одвојен за испитивање присуства нуклеинске киселине вируса Аујескијеве болести, примјеном методе квантитативне реакције ланчане полимеразе у реалном времену (qPCR). Узорак мозга је хомогенизован коришћењем авана и тучка, након чега је помијешан у односу 1:10 са фосфатним пуфером и центрифугиран на 4500 обртаја током 10 минута. Добијени супернатант је сакупљен и замрзнут на -80°C до даље анализе. Вирусна ДНК је екстрахована коришћењем *Indical IndiSpin* кита за екстракцију, у складу са упутствима произвођача. Амплификација вирусне нуклеинске киселине изведена је помоћу претходно објављених прајмера од стране Ма и сар. (2008). За qPCR је коришћен комеријални *Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA, US), а температурни профил реакције обухватао је следеће кораке: денатурација ДНК вируса на 95°C током 1 минута (1 циклус), везивање прајмера на 95°C током 15 секунди (50 циклуса) и синтеза ДНК ланца на 60°C током 30 секунди. Реакциона смјеша укупне запремине 12,5 μl припремана је додавањем 2,75 μl *Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix*, 0,50 μl *F* прајмера (10 μM), 0,50 μl *R* прајмера (10 μM), 0,25 μl пробе (10 μM) и 2,5 μl нуклеинске киселине.

РЕЗУЛТАТИ

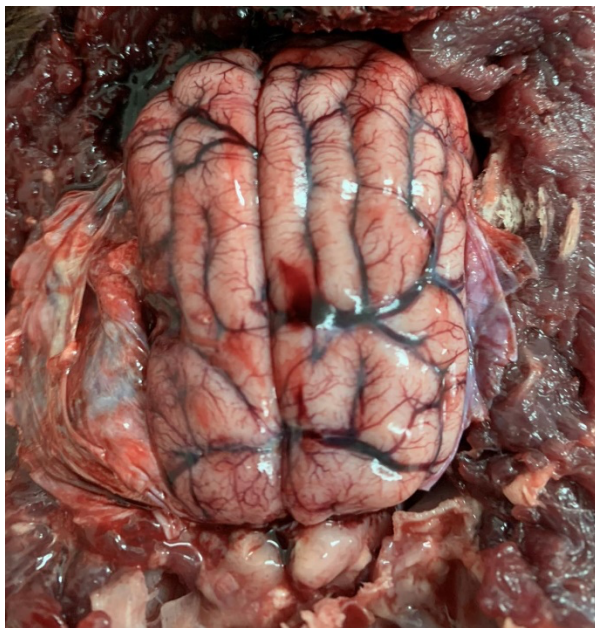
Према анамнестичким и епизоотиолошким подацима узетих од власника, куја је у току лова дошла у директан контакт са дивљом свињом, а непосредно након лова лизала је крв са леша одстрелене дивље свиње и трагове крви који су остајали у околини након уклањања леша. Након 24 часа, пас је испољавао неспецифичне знаке обољења у виду повраћања, инапетенце, летаргије и фебре. Након 30-36 часова од појаве првих знакова болести, јавили су се знаци неуролошких поремећаја: нагињање главе на страну, хиперсаливација и пруритус до аутомутилације у предјелу главе. Неуролошки поремећаји су се у току неколико часова интензивирали. До угинућа је дошло након 36 часова од појаве неуролошких знакова обољења.

Макроскопске промјене установљене спољашњим прегледом леша су се карактерисале налазом лезија на кожи главе у виду бездлачних, хиперемичних подручја на ушним шкољкама, доњој страни врата, око очију и на њушци, те

хиперимијом конјунктива (Слика 1). Након уклањања коже уочена је лимфаденопатија подвичичних лимфних чворова. Унутрашњим прегледом установљена су хиперимија и крвављења на плућа, те хиперимија можданих опни и иницираност крвних судова мозга (Слика 2). На јетри је установљена блажа хиперимија. Такође, установљена је и дискретна дилатација желуца и торзија слезине на десну страну, највјероватније настала као посљедица акутног шока и бола (Слика 3).



Слика 1 А, Б: Лезије на кожи главе као посљедица аутомутилације; Ц: Хиперимија конјунктиве



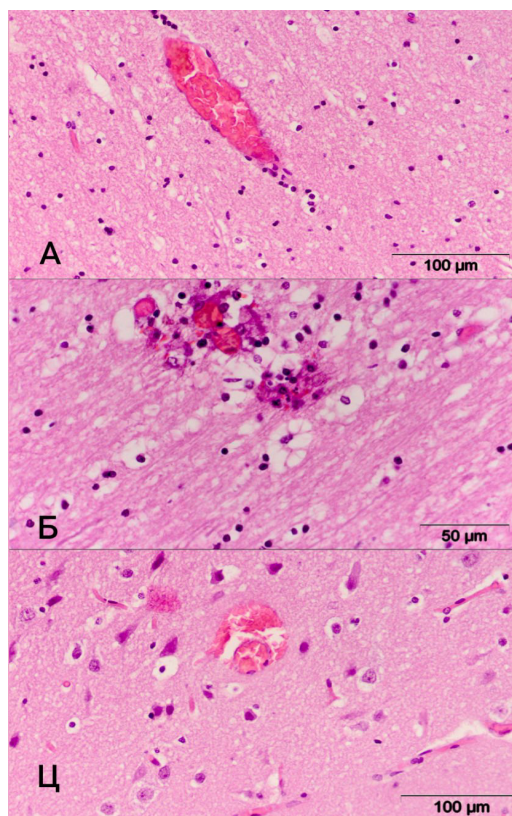
Слика 2 Мозак након одвајања тврде можданице, хиперемија и иницираност крвних судова



Слика 3 Дискретна дилатација желуца и торзија слезине на десну страну

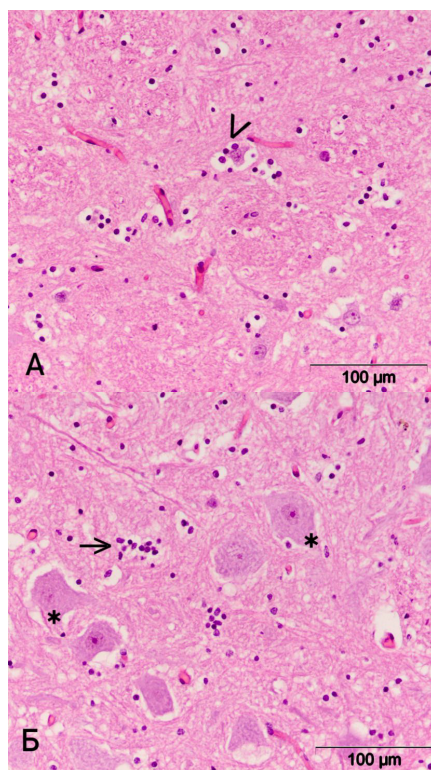
Хистопатолошким прегледом утврђен је негнојни менингоенцефалитис са пратећим феноменима у мозгу и продуженој мождини. Промјене у мозгу је

карактерисао налаз дискретног периваскуларног мононуклеарног инфилтрата с лимфоцитима и хистиоцитима, те периваскуларним крвављењима (Слика 4). Промјене у продуженој мождини су се карактерисале налазом сателитозе и неуронофагије, фокалне акумулације глија ћелија, дегенерације и некрозе неурона (Слика 5). У неуронима продужене мождине установљено је присуство интрануклеарних еозинofilних инклузија (Слика 6). Промјене установљене у другим органима чиниле су деплеција лимфоцита у герминативним центрима лимфних чворова, хиперемија, едем и емфизем плућа, те умјерена хиперемија јетре и дискретно изражено мутно бубрење хепатоцита.

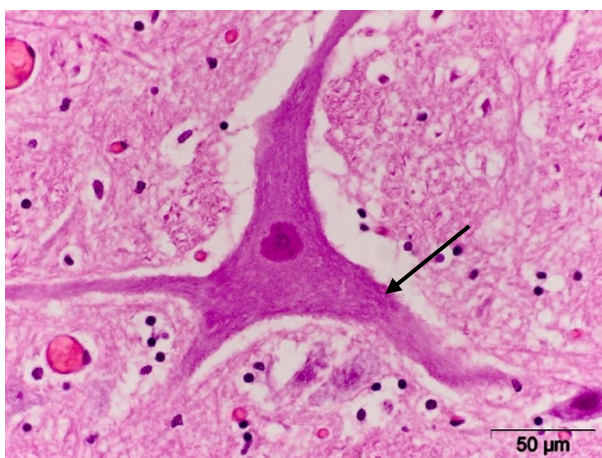


Слика 4 Мозак

А, Б: Дискретан периваскуларни мононуклеарни инфилтрат, ХЕ $\times$ 400, ХЕ $\times$ 600; Ц: Периваскуларно крвављење, ХЕ $\times$ 400



Слика 5 Продужена моздина
А: неуронофагија (глава стрелице), ХЕ $\times$ 400; Б: фокална акумулација глија
ћелија (стрелица), дегенерација и некроза неурона (звјездица), ХЕ $\times$ 400



Слика 6 Продужена моздина – интранукларне еозинифилне инклузије
(стрелица), ХЕ $\times$ 600

Методом qPCR детектована је ДНК вируса Аујескијевог болести (херпесвирус свиња типа 1) у узорцима ткива мозга и лезија коже.

ДИСКУСИЈА

Дивље свиње представљају бројчано значајну дивљач на простору Балканског полуострва, а захваљујући репродуктивном потенцијалу могу се сврстати у једну од инвазивнијих дивљих врста. Богате шуме, као и доступност извора воде овој дивљачи пружају како уточиште, тако и неисцрпан извор хране, што објашњава њихову бројност. Лов је традиционална активност на просторима Републике Српске, а дивље свиње представљају често ловљену дивљач. У лову на дивље свиње традиционално се користе ловачки пси, углавном гоничи, тако да је током ове активности контакт паса и дивљих свиња (гоњење и облајавање) неминован. Након одстрела пси често долазе у контакт са трупом одстрелене животиње, али и са њиховим месом и унутрашњим органима. Аујескијева болест је спорадично присутна у популацији домаћих и дивљих свиња на територији Републике Српске. У периоду 2019. до фебруара 2024. године, забиљежена су 44 жаришта, односно обољење је потврђено код 209 домаћих свиња и 3 пса. Болест је присутна у свим државама из окружења (Ћерне и сар., 2023; Milicevic и сар., 2016; Lazić и сар., 2017), као и на територији Европе (Cay и Letellier, 2009; Ciarello и сар., 2022). Ciarello и сар. (2022) наводе да постоји висока преваленца болести на фармама свиња на Сицилији, као и да су забиљежени случајеви заражавања код говеда. На Сицилији се Аујескијева болест ријетко појављује код паса, а описана је код два ловачка пса. У тим случајевима пси су конзумирали термички необрађено месо суспектне дивље свиње након лова. У периоду 1995-2022. година, Freuling и сар. (2023) су детектовали Аујескијеву болест код 35 паса и 3 лисице у Њемачкој. Код већине паса испољавање знакова болести епидемиолошки је било повезано с конзумацијом термички необрађеног меса дивљих свиња или контактом с дивљим свињама. Пси као и други карнивори се заражавају вирусом у директном или индиректном контакту са свињама и ингестијом сировог или термички недовољно обрађеног меса и унутрашњих органа. Спорадично појављивање болести, као и кратак клинички ток, условљавају да Аујескијева болест код карнивора често буде недијагностикована.

Сапо-Terriza и сар. (2019) наводе да директан контакт представља потенцијални ризик заражавања код ловачких паса. Они описују експозицију ловачких паса вирусом Аујескијевог болести у високо ендемичном подручју за овај вирус код дивљих свиња у Шпанији. Ciarello и сар. (2022) у свом раду наводе пруритус до аутомутилације као доминантан неуролошки симптом. Sehl и Teifke (2020) у свом раду наводе негнојни енцефалитис као доминантан хистопатолошки налаз у нервном ткиву. Такође, описују хистопатолошки налаз у јетри и плућима, који се карактерише некрозама, крвављењима и инфламацијом.

У периоду 2006-2020. године у Словенији су описани случајеви појаве Аујескијевог болести код ловачких паса и доминантан хистопатолошки налаз у

тим случајевима било је присуство негнојног менингоенцефалитиса (Ћерне и сар., 2003). Бројни аутори, такође, као досљедан хистопатолошки налаз код Аујескијевој болести детектују негнојни енцефалитис с васкулитисом (Freuling и сар., 2023). Cay и Letellier (2009) потврдивши Аујескијевој болест код два ловачка пса у Белгији изолацијом вируса и примјеном Real Time PCR (RT-PCR) методе, наводе да је код паса након лова дошло до појаве карактеристичних неуролошких знакова болести. У Италији је Аујескијева болест детектована код ловачког пса старог седам година, који је био у контакту са крвљу дивље свиње (Pizzurto и сар., 2016). Употребом RT-PCR и изолацијом на култури ћелија бубрега кунића (RK13) доказан је херпес вирус свиња тип 1.

ЗАКЉУЧАК

На основу епизоотиолошке анамнезе, клиничке слике и хистопатолошког налаза, постављена је сумња на Аујескијевој болест, а на основу резултата молекуларних испитивања потврђено присуство вируса Аујескијевој болести код ловачког пса. Спорадично заражавање ловачких паса указује на циркулацију вируса у популацији дивљих свиња у Републици Српској. У складу с наведеним, термичка обрада меса и унутрашњих органа дивљих свиња је обавезна.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Српске, Ресор за ветеринарство.

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Cano-Terriza D., Martínez R., Moreno A., Pérez-Marín J. E., Jiménez-Ruiz S., Paniagua J., Borge C., García-Bocanegra I. (2019): Survey of Aujeszky's Disease Virus in Hunting Dogs from Spain. *Ecohealth*, 16(2):351-355.
- Cay A. B., Letellier C. (2009): Isolation of Aujeszky's disease virus from two hunting dogs in Belgium after hunting wild boar. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78(3):194-195.
- CFSPH (2017). Pseudorabies. Aujeszky's Disease. Mad Itch. Infectious Bulbar Paralysis. The Center for Food Security of Public Health, 1-9.
- Ciarello F. P., Moreno A., Mirgaliotta N., Antonino A., Michele E., Purpari G., Amato B., Ippolito D., Lo Presti V. D. M. (2022): Aujeszky's disease in hunting dogs after the ingestion of wild boar raw meat in Sicily (Italy): clinical, diagnostic and phylogenetics features. *BMC Vet Res*, 18(1):27.
- Ћерне D., Hostnik P., Toplak I., Juntos P., Paller T., Kuhar U. (2023): Detection of Pseudorabies in Dogs in Slovenia between 2006 and 2020: From Clinical and Diagnostic Features to Molecular Epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases*, ID 4497806, 1-11.

- Deblanc C., Oger A., Simon G., Le Potier M. F. (2019): Genetic Diversity among Pseudorabies Viruses Isolated from Dogs In France from 2006 to 2018. *Pathogens*, 8(4):266.
- Freuling C. M., Hlinak A., Schulze C., Sehl-Ewert J., Wysocki P., Szentiks C. A., Schmitt K., Wohlsein P., Kluth G., Reinhardt I., Mettealeiter T. C., Müller T. (2023): Suid alphaherpesvirus 1 of wild boar origin as a recent source of Aujeszky's disease in carnivores in Germany. *Virol J.*, 20(1):110.
- Koshemetov Z. K., Kondibayeva Z. B., Mussojev A. M., Abishov A. A., Omarbekova U. Zh. (2021): Epizootic situation of Aujeszky's disease within the territory of the Republic of Kazakhstan. *Open Veterinary Journal*, 11(1):135-143.
- Laval K., Enquist L. W. (2020): The Nerupathic Itch Caused by Pseudorabies Virus. *Pathogens*, 9(4):254.
- Lazić G., Petrović T., Lupulović D., Topalski B., Božić B., Lazić S. (2017): Aujeszky's disease in a dog - case report. *Arhiv veterinarske medicine*, 10(1):61-69.
- Ma W., Lager K. M., Richt J. A., Stoffregen W. C., Zhou F., Yoon K. J. (2008): Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J Vet Diagn Invest.*, 20(4):440-7.
- Milicevic V., Radojicic S., Valcic M., Iovic V., Radosavljevic V. (2016): Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. *BMC Vet Res*, 12(1):134.
- Pejsak Z. K., Truszczyński M. (2006): Aujeszky's disease (Pseudorabies) In Diseases of Swine, Ninth Edition. Eds. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor, Blackwell Science, 419-433.
- Pizzurro F., Mangone I., Zaccaria G., De Luca E., Malatesta D., Innocent M., Carmine I., Cito F., Maracacci M., Di Sabatino D., Lorusso A. (2016): Whole-genome sequence of a suid herpesvirus – 1 strain isolated from the brain of a hunting dog in Italy. *Genome Announc*, 4(6):e01333-16.
- Sehl J., Teifke J. P. (2020): Comparative Pathology of Pseudorabies in Different Naturally and Experimentally Infected Species – A Review. *Pathogens*, 9(8):633.
- Софреновић Ђ., Кнежевић Н. (1994): Основне патолошке карактеристике важнијих инфективних болести домаћих животиња. Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, 19-20.
- WOAH (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.1.2. Aujeszky's disease (Infection with Aujeszky's disease virus). World Organisation for Animal Health, 1-19.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401211G

UDK 636.7.09:[616.98:578.825

Original Scientific Paper

AUJESZKY'S DISEASE IN HUNTING DOG IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF SRPSKA

Srđan GLIGORIĆ^{1*}, Dragan KNEŽEVIĆ¹, Dragan KASAGIĆ¹, Dimitrije GLIŠIĆ², Darko MARINKOVIĆ³

¹ PI Veterinary Institute of the Republic of Srpska "Dr Vaso Butozan" Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

²Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

³University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Srđan Gligorić, srdjan.gligoric@virs-vb.com

Summary

Aujeszky's disease (pseudorabies) is an acute, contagious, viral disease, primarily of pigs, and then of other species of domestic and wild animals, caused by porcine herpesvirus type 1. In pigs, the infection is enzootic, with a high mortality rate upon the first entry of the virus into the group and is characterized by encephalitis and a high mortality rate in piglets, pneumonia in older pigs, and abortions in sows. The disease occurs sporadically in secondary hosts and is accompanied by a short incubation period and a fatal outcome. Carnivores become infected through direct or indirect contact with pigs and ingestion of raw or undercooked meat and internal organs, and is characterized by neurological disorders in the form of pruritus to self-mutilation.

The paper describes a case of Aujeszky's disease in the territory of the city of Teslić in 2024, in a hunting dog of the Plot breed, which came into direct physical contact with a wild boar during hunting, as well as the carcass of a shot animal. Initial signs of the disease appeared after 24 hours in the form of inappetence, fever and vomiting. After the initial signs, neurological disorders manifested in the form of tilting the head to the side, hypersalivation and pruritus, which progressed to self-mutilation in the head area. Death occurred 36 hours after the onset of neurological disorders. Macroscopic examination revealed lesions on the skin of the head and neck, conjunctival hyperemia, generalized lymphadenopathy, hyperemia of the lungs, meninges and brain. Gastric dilatation with right-sided splenic torsion was also found, most likely as a result of acute shock and pain. Histopathological analysis revealed non-suppurative meningoencephalitis, characterized by discrete perivascular mononuclear infiltrates and perivascular hemorrhages in the cerebrum, gliosis, satellitosis, and neuronophagia in the medulla oblongata, as well as intranuclear eosinophilic inclusions in medulla oblongata neurons. The results of molecular analysis of brain tissue and tissue from skin lesions, using the qPCR method, demonstrated the presence of porcine herpesvirus type 1 nucleic acid in the examined samples.

Sporadic infection of hunting dogs may indicate virus circulation in the wild boar population in the Republic of Srpska.

Key words: Aujeszky's disease, porcine herpesvirus type 1, hunting dog, non-purulent meningoencephalitis.

INTRODUCTION

Aujeszky's disease (pseudorabies) is an acute, contagious, viral disease primarily of pigs, and then of other species of domestic and wild animals. The causative agent is swine herpesvirus type 1 (*Suid herpesvirus 1*), a DNA virus from the genus *Varicellovirus*, from the subfamily *Alphaherpesvirinae*, which is included in the family *Herpesviridae* (WOAH, 2018). Aujeszky's disease does not have zoonotic potential (CFSPH, 2017). Due to its strong potential to cause infection of nervous tissue, and on the other hand due to its septicemic-viscerotropic pathological effects on other organ systems, it is defined as a pantropic virus with pronounced neurotropism (Sofrenović and Knežević, 1994). In pigs, the infection is enzootic in nature, with a high mortality rate upon the first entry of the virus into the herd. The manifestation of clinical signs of the disease in pigs depends primarily on the age of the animal, and then on the immune status, farm management and virulence of the pathogen. The disease in pigs is characterized by encephalitis and a high mortality rate in piglets, pneumonia in older pigs and abortions in pregnant sows (Pejsak and Truszczynski, 2006; Koshemetov et al., 2021). However, in domestic and wild pigs, latent infection with localization of the virus in the nerve ganglia can often develop. In this way, conditions for active or passive carriership are created, and domestic and wild pigs represent a reservoir of the virus for secondary hosts (most often sheep, cattle, carnivores) (Milicevic et al., 2016; Sehl and Teifke, 2020). In secondary hosts, the disease occurs sporadically, is characterized by a short incubation period and a fatal outcome. Sheep and cattle become infected when cohabiting with pigs (Deblanc et al., 2019; Ciarello et al., 2022). Carnivores become infected through direct or indirect contact with pigs, or by ingestion of raw or undercooked meat and internal organs. After initial, nonspecific signs of the disease, signs of neurological disorders appear in the form of pruritus, which can progress to self-mutilation. Pruritus in secondary hosts is a manifestation of trigeminal ganglioneuritis, infection of the dorsal root ganglia and paravertebral ganglia. Pigs do not show signs of pruritus (Laval and Enquist, 2020).

MATERIALS AND METHODS

An autopsy of the dog was performed in 2024, with suspicion that the death occurred due to Aujeszky's disease. The material for the autopsy was the carcass of a deceased hunting dog of the Plot breed from the territory of the city of Teslić, aged 19 months, intact bitch, in good condition. After the autopsy, brain and medulla oblongata, lymph nodes, liver and lung tissues were sampled for histopathological analysis. After fixation in 10% neutral buffered formalin, the tissues were dehydrated in a series of alcohols,

enlighten in xylene and, after impregnation in liquid paraffin, embedded in paraffin molds. Tissue sections 3-5 μm thick were stained with hematoxylin and eosin.

A portion of the brain tissue sample was separated for testing for the presence of Aujeszky's disease virus nucleic acid using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The brain sample was homogenized using a mortar and pestle, then mixed 1:10 with phosphate buffer and centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes. The resulting supernatant was collected and frozen at -80°C until further analysis. Viral DNA was extracted using the Indical IndiSpin Extraction Kit, according to the manufacturer's instructions. Viral nucleic acid amplification was performed using previously published primers by Ma et al. (2008). For qPCR, a commercial *Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) was used, and the reaction temperature profile included the following steps: viral DNA denaturation at 95°C for 1 minute (1 cycle), primer binding at 95°C for 15 seconds (50 cycles), and DNA strand synthesis at 60°C for 30 seconds. A reaction mixture with a total volume of 12.5 μl was prepared by adding 2.75 μl *Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix*, 0.50 μl F primer (10 μM), 0.50 μl R primer (10 μM), 0.25 μl probe (10 μM), and 2.5 μl nucleic acid.

RESULTS

According to the anamnestic and epizootiological data taken from the owner, the bitch came into direct contact with a wild boar during the hunt, and immediately after the hunt she licked the blood from the carcass of the shot wild boar and traces of blood that remained in the environment after the carcass was removed. After 24 hours, the dog showed non-specific signs of illness in the form of vomiting, inappetence, lethargy and fever. After 30-36 hours from the appearance of the first signs of illness, signs of neurological disorders appeared: tilting the head to the side, hypersalivation and pruritus up to self-mutilation in the head area. Neurological disorders intensified over several hours. Death occurred 36 hours after the appearance of neurological signs of illness.

Macroscopic changes determined by external examination of the carcass were characterized by lesions on the scalp in the form of hairless, hyperemic areas on the auricles, lower neck, around the eyes and on the muzzle, and hyperemia of the conjunctiva (Figure 1). After removal of the skin, lymphadenopathy of the submandibular lymph nodes was observed. Internal examination revealed hyperemia and hemorrhages in the lungs, as well as hyperemia of the meninges and initiation of blood vessels in the brain (Figure 2). Mild hyperemia was determined in the liver. Also, discrete dilatation of the stomach and torsion of the spleen to the right side were determined, most likely as a result of acute shock and pain (Figure 3).



Figure 1 A, B: Scalp lesions as a result of self-mutilation; C: Hyperemia of the conjunctiva

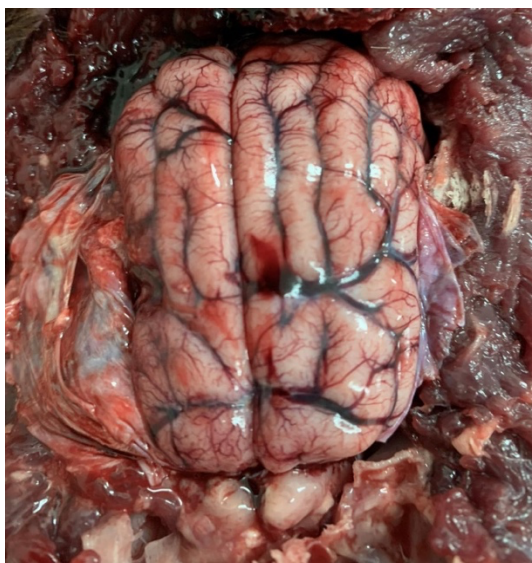


Figure 2 Brain after separation of the dura mater, hyperemia and initiation of blood vessels



Figure 3 Discreet dilatation of the stomach and torsion of the spleen to the right side

Histopathological examination revealed non-purulent meningoencephalitis with accompanying phenomena in the brain and medulla oblongata. Changes in the brain were characterized by the finding of a discrete perivascular mononuclear infiltrate with lymphocytes and histiocytes, and perivascular hemorrhages (Figure 4). Changes in the medulla oblongata were characterized by the finding of satellitosis and neuronophagy, focal accumulation of glial cells, degeneration and necrosis of neurons (Figure 5). The presence of intranuclear eosinophilic inclusions was found in the neurons of the medulla oblongata (Figure 6). Changes found in other organs consisted of lymphocyte depletion in the germinal centers of the lymph nodes, hyperemia, edema and emphysema of the lungs, and moderate liver hyperemia and discretely expressed cloudy swelling of hepatocytes.

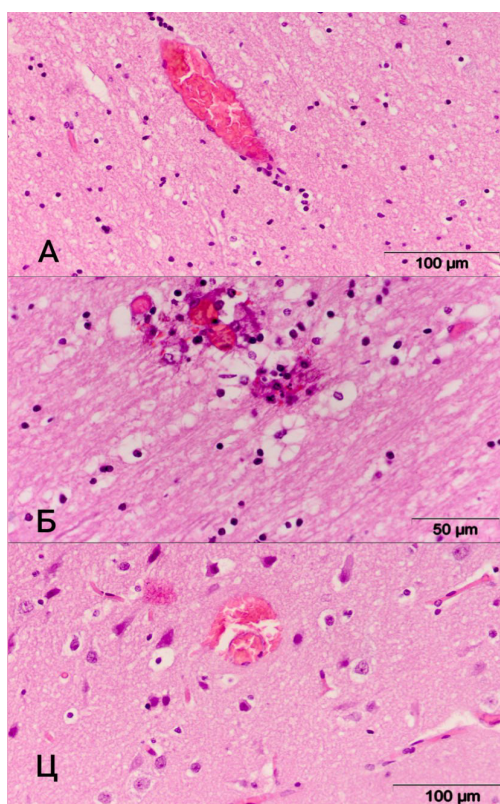


Figure 4 Brain

A, B: Discrete perivascular mononuclear infiltrates, HE $\times$ 400, HE $\times$ 600; C: Perivascular bleeding, HE $\times$ 400

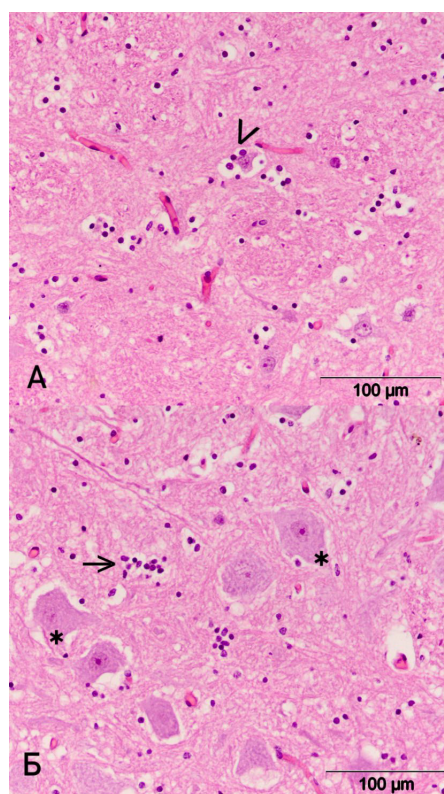


Figure 5 Medulla oblongata

A: neuronophagia (arrowhead), HE $\times$ 400; B: focal accumulation of glial cells (arrow), degeneration and necrosis of neurons (asterisk), HE $\times$ 400

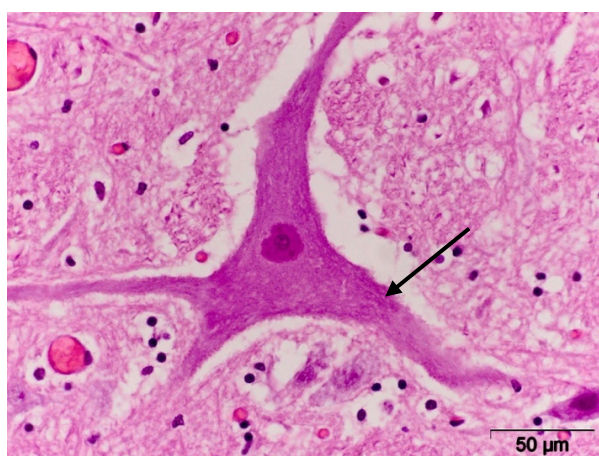


Figure 6 Medulla oblongata – intranuclear eosinophilic inclusions (arrow), HE $\times$ 600

The qPCR method detected Aujeszky's disease virus (porcine herpesvirus type 1) DNA in brain tissue samples and skin lesions.

DISCUSSION

Wild boars are a numerically significant game species on the Balkan Peninsula, and thanks to their reproductive potential, they can be classified as one of the more invasive wild species. Rich forests, as well as the availability of water sources, provide this game with both a refuge and an inexhaustible source of food, which explains their large numbers. Hunting is a traditional activity in the Republic of Srpska, and wild boars are a frequently hunted game species. Hunting dogs, mainly hounds, are traditionally used in wild boar hunting, so during this activity, contact between dogs and wild boars (chasing and barking) is inevitable. After shooting, dogs often come into contact with the carcass of the shot animal, but also with its meat and internal organs. Aujeszky's disease is sporadically present in the population of domestic and wild boars on the territory of the Republic of Srpska. In the period from 2019 to February 2024, 44 outbreaks were recorded, i.e. the disease was confirmed in 209 domestic pigs and 3 dogs. The disease is present in all surrounding countries (Černe et al., 2023; Milicevic et al., 2016; Lazić et al., 2017), as well as in Europe (Cay and Letellier, 2009; Ciarello et al., 2022). Ciarello et al. (2022) report that there is a high prevalence of the disease on pig farms in Sicily, and that cases of infection in cattle have been recorded. In Sicily, Aujeszky's disease rarely occurs in dogs, and it has been described in two hunting dogs. In these cases, the dogs consumed uncooked meat of suspected wild boar after hunting. In the period 1995-2022, Freuling et al. (2023) detected Aujeszky's disease in 35 dogs and 3 foxes in Germany. In most dogs, the manifestation of signs of the disease was epidemiologically associated with the consumption of undercooked wild boar meat or contact with wild boar. Dogs, like other carnivores, become infected with the virus through direct or indirect contact with pigs and the ingestion of raw or undercooked meat and internal organs. The sporadic occurrence of the disease, as well as the short period of clinical signs, are the reasons why Aujeszky's disease in carnivores is often undiagnosed.

Cano-Terriza et al. (2019) report that direct contact poses a potential risk of infection in hunting dogs. They describe the exposure of hunting dogs to Aujeszky's disease virus in a highly endemic area for this virus in wild boars in Spain. Ciarello et al. (2022) report pruritus to the point of self-mutilation as the dominant neurological symptom. Sehl and Teifke (2020) report non-suppurative encephalitis as the dominant histopathological finding in nervous tissue. They also describe histopathological findings in the liver and lungs, characterized by necrosis, hemorrhage, and inflammation.

In the period 2006-2020, cases of Aujeszky's disease in hunting dogs were described in Slovenia, and the dominant histopathological finding in these cases was the presence of non-purulent meningoencephalitis (Černe et al., 2003). Numerous authors also detect non-purulent encephalitis with vasculitis as a consistent histopathological

finding in Aujeszky's disease (Freuling et al., 2023). Cay and Letellier (2009), having confirmed Aujeszky's disease in two hunting dogs in Belgium by virus isolation and the application of the Real Time PCR (RT-PCR) method, state that characteristic neurological signs of the disease appeared in the dogs after hunting. In Italy, Aujeszky's disease was detected in a seven-year-old hunting dog that had been in contact with wild boar blood (Pizzurro et al., 2016). Porcine herpes virus type 1 was proven using RT-PCR and isolation on rabbit kidney cell culture (RK13).

CONCLUSION

Based on the epizootiological history, clinical picture and histopathological findings, Aujeszky's disease was suspected, and based on the results of molecular testing, the presence of Aujeszky's disease virus in a hunting dog was confirmed. Sporadic infection of hunting dogs indicates the circulation of the virus in the wild boar population in the Republic of Srpska. Accordingly, thermal processing of meat and internal organs of wild boars is mandatory.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of Republic of Srpska, Veterinary Directorate.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Cano-Terriza D., Martínez R., Moreno A., Pérez-Marín J. E., Jiménez-Ruiz S., Paniagua J., Borge C., García-Bocanegra I. (2019): Survey of Aujeszky's Disease Virus in Hunting Dogs from Spain. *Ecohealth*, 16(2):351-355.
- Cay A. B., Letellier C. (2009): Isolation of Aujeszky's disease virus from two hunting dogs in Belgium after hunting wild boar. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78(3):194-195.
- CFSPH (2017). Pseudorabies. Aujeszky's Disease. Mad Itch. Infectious Bulbar Paralysis. The Center for Food Security of Public Health, 1-9.
- Ciarello F. P., Moreno A., Mirgaliotta N., Antonino A., Michele E., Purpari G., Amato B., Ippolito D., Lo Presti V. D. M. (2022): Aujeszky's disease in hunting dogs after the ingestion of wild boar raw meat in Sicily (Italy): clinical, diagnostic and phylogenetics features. *BMC Vet Res*, 18(1):27.
- Černe D., Hostnik P., Toplak I., Juntos P., Paller T., Kuhar U. (2023): Detection of Pseudorabies in Dogs in Slovenia between 2006 and 2020: From Clinical and Diagnostic Features to Molecular Epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases*, ID 4497806, 1-11.
- Deblanc C., Oger A., Simon G., Le Potier M. F. (2019): Genetic Diversity among Pseudorabies Viruses Isolated from Dogs In France from 2006 to 2018. *Pathogens*, 8(4):266.
-

- Freuling C. M., Hlinak A., Schulze C., Sehl-Ewert J., Wysocki P., Szentiks C. A., Schmitt K., Wohlsein P., Kluth G., Reinhardt I., Mettealeiter T. C., Müller T. (2023): Suid alphaherpesvirus 1 of wild boar origin as a recent source of Aujeszky's disease in carnivores in Germany. *Virology*, 20(1):110.
- Koshemetov Z. K., Kondibayeva Z. B., Mussojev A. M., Abishov A. A., Omarbekova U. Zh. (2021): Epizootic situation of Aujeszky's disease within the territory of the Republic of Kazakhstan. *Open Veterinary Journal*, 11(1):135-143.
- Laval K., Enquist L. W. (2020): The Nerupathic Itch Caused by Pseudorabies Virus. *Pathogens*, 9(4):254.
- Lazić G., Petrović T., Lupulović D., Topalski B., Božić B., Lazić S. (2017): Aujeszky's disease in a dog - case report. *Arhiv veterinarske medicine*, 10(1):61-69.
- Ma W., Lager K. M., Richt J. A., Stoffregen W. C., Zhou F., Yoon K. J. (2008): Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J Vet Diagn Invest.*, 20(4):440-7.
- Milicevic V., Radojicic S., Valcic M., Ivovic V., Radosavljevic V. (2016): Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. *BMC Vet Res*, 12(1):134.
- Pejsak Z. K., Trusczyński M. (2006): Aujeszky's disease (Pseudorabies) In Diseases of Swine, Ninth Edition. Eds. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor, Blackwell Science, 419-433.
- Pizzurro F., Mangone I., Zaccaria G., De Luca E., Malatesta D., Innocent M., Carmine I., Cito F., Maracacci M., Di Sabatino D., Lorusso A. (2016): Whole-genome sequence of a suid herpesvirus – 1 strain isolated from the brain of a hunting dog in Italy. *Genome Announc*, 4(6):e01333-16.
- Sehl J., Teifke J. P. (2020): Comparative Pathology of Pseudorabies in Different Naturally and Experimentally Infected Species – A Review. *Pathogens*, 9(8):633.
- Sofrenović Đ., Knežević N. (1994): Basic pathological characteristics of the most important infectious diseases of domestic animals. University of Belgrade, Faculty of veterinary medicine, 19-20.
- WOAH (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.1.2. Aujeszky's disease (Infection with Aujeszky's disease virus). World Organisation for Animal Health, 1-19.
-

DOI 10.7251/VETJSR2401221B

UDK 636.2.09+636.083.312]:579.842.11

Pregledni naučni rad

ZNAČAJ OCENE I STALNE KONTROLE BIOSIGURNOSTI NA FARMAMA GOVEDA I SVINJA

Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Sreten NEDIĆ¹, Sveta ARSIĆ¹, Aleksandra MITROVIĆ¹, Ivan PAVLOVIĆ², Milan NINKOVIĆ², Jasna PRODANOV-RADULOVIĆ³

¹Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

²Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

³Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Srbija

*Korespondentni autor: Jovan Bojkovski, jovan_bojkovski@yahoo.com

Sažetak

Biosigurnost, dobrobit, dobra proizvođačka praksa i analiza rizika veoma su značajni elementi za intenzivnu proizvodnju na farmama visoko mlečnih krava i svinja. Planska primena biosigurnosnih mera presudna je u zaštiti zdravlja goveda i svinja i uspehu same proizvodnje. Preporuka je da se stalno izgrađuje svest zaposlenih o unapređenju biosigurnosti, da postoji aktivan odnos prema postojećim rizicima i da preduzete mere predstavljaju ključ uspeha u osmišljavanju i pripremi planova biosigurnosti za svaku konkretnu situaciju, odnosno farmu. Opšte je poznato da previdi, propusti i greške u održavanju potrebnog nivoa biosigurnosti obično dovode do nastanka oboljenja, pada obima proizvodnje, uginuća i gubitka zarade. Zato se na zdravstvenu zaštitu goveda i svinja primenom značajno više preventivnih mera može ispuniti koncept u kome će se realizovati rentabilna proizvodnja na farmama. Potrebno je da se istakne da je primena biosigurnosnih mera na farmama goveda i svinja danas najvažnija mera za sprečavanje potencijalnog unošenja i širenja patogenih uzročnika. Stoga mere biosigurnosti moraju biti dobro definisane, praktične, funkcionalne i razumljive farmerima odnosno odgajivačima goveda i svinja. U ovom radu prikazana je ocena stalne kontrole biosigurnosti na farmama goveda i svinja, kao deo realizovanih projektnih zadataka.

Ključne reči: biosigurnost, zdravstvena zaštita, goveda, svinja.

UVOD

Biosigurnost na farmama

Generalno, danas u literaturi postoje brojne definicije biosigurnosti odnosno biosigurnosnih mera, koje mogu biti razmatrane sa različitih aspekata kao i za različite proizvodne sisteme. Međutim, može se reći da je zajedničko svim definicijama da biosigurnost obuhvata skup mera i postupaka koji imaju za osnovni cilj umanjeње rizika od unošenja, pojave i širenja različitih uzročnika bolesti u odnosu na farmu

свинја, без обзира на обим производње (Alarcón i sar. 2021; Prodanov-Radulović i sar., 2022).

Pri razmatranju stanja биосигурности на farmском nivou треба истовремено имати у виду сродне, али у извесној мери различите концепте: планове биосигурности, процену ризика на критичним контролним тачкама и планове за ургентне ситуације. Биосигурносни планови су кључни за превенцију узгојних и инфективних болести. Такође су биосигурносни планови кључни у спречавању нежељених ситуација и унапређењу пословања (Stanković i sar., 2015a; Stanković i sar., 2016; Hristov i sar., 2006, Polaček i sar., 2021).

Intenzivna производња у говедарству и свинјарству подразумева велику концентрацију животиња на relativно малом простору, због чега је потребно применити одређене мере у циљу очувања здравља стада говеда и свинја, спречавања уношења и ширења узгојних и инфективних болести у стаду и очувања производње (WQ, 2009; Bojkovski, 2015; Bojkovski i sar., 2017; Bojkovski i sar., 2020). Примена биосигурносних планова подразумева сталну активност на стварању и очувању задовољјавajuћег окружења за живот животиња и њихову производњу, пре свега у погледу спречавања уношења и ширења узрочника инфективних болести, а добија на значају како тржиште говедег mesa, млечних производа и свинјског mesa све више поprima internacionalни карактер (Stanković i sar., 2011).

Mнога решења која се примењују на farmama високо млечних крава и свинја у циљу побољшања profitabilности, повећања ефикасности и безбедности производње често узрокују nelagodnost, бол и стрес односно distress животиња, док спречавају њихово природно инстинктивно понашање, што се у највећој мери огледа у економским резултатима производње (Hristov i sar., 2018). Previdi, propusti i greške у održavanju потребног nivoa биосигурности обично доводе до појаве оболjenja, smanjenja обима производње, uginuća и gubitka zarade, ugrožavajući на тај начин opstanak читавих стада говеда и свинја (Hristov i sar., 2007).

Pojam биосигурности подразумева три главна чиниоца:

1. Izolaciju, kojom се sprečava kontakt jedinki из kontrolisanog окружења и okoline, а односи се на novonabavljene животиње, kontakte između postojećih grupa говеда podeljenih prema uzrastu и/или на производне grupe, као производне operacije koje се ponavljaju kod više grupa животиња, poput hranjenja, utovara и sl.
2. Kontrolu prometa, koja подразумева nadzor nad kretanjem vozila, ljudi и свих животиња са farme и prema farmi и мора бити osmišljena тако да spreči или minimalizuje rizik од ulaska patogena у zapat и kontaminaciju hrane и opreme.
3. Sanitaciju, koja се односи на dezinfekciju materijala и opreme koja ulazi на farmu и higijenu ljudi и opreme на farmi (Hristov i sar., 2007).

Oцена postavke биосигурности на farmи

Ne postoji јединствен план биосигурности за све farme млечних крава и свинја. Postizanje потребног nivoa биосигурности на farmи млечних крава подразумева план који је nastao

анализом актуелне епизоотиолошке ситуације на подручју на ком се фарма налази (Stanković i sar., 2008; Stanković i sar., 2011).

Бројни ограничавајући фактори отежавају достизање потребног нивоа заштите здравља стада и успеха производње. Величина запата и обим производње разумљиво у великој мери ограничавају обим и квалитет предузетих мера, што се може рећи и за интензитет производње. То практично значи да економска исплативост мора имати пресудну улогу у погледу одређивања циљева које је потребно остварити применом nekог плана биосигурности, или бар појединих биосигурносних мера, iskazanih у виду добре одгајивачке праксе, добре ветеринарске праксе или HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) оријентисаних планова (Ostojić-Andrić i sar., 2017).

На фармима говеда и свинја које су биле укључене у пројектна истраживања уочени су пропусти у примени одређених биосигурносних мера. Циљ овог прегледног рада, који је био део пројектних задатака је да пружи информације везано за усавршавање односно увођење биосигурносних мера на фармима високо млечних крава и свинја.

Индикатори биосигурности на фарми

1. Изолација као елемент биосигурности на фарми

Локација фарме представља кључни елемент одрживог биосигурносног плана. Издвојеност објеката за одгој у односу на потенцијалне изворе патогених микроорганизама представља важну меру заштите, нарочито када су у питању аерогене инфекције (Stanković i sar., 2015b). Ово значи да локацију одређује низ повезаних фактора, од којих се удаљеност може најлакше измерити, али она укључује и тип и величину фарме, доминантне ветрове, влажност ваздуха и др. Gotovo редовно се занемарује значај зеленог заштитног појаса око самих фарми (Hristov i sar., 2007; Stanković i sar., 2015b).

2. Карантин

Novonabavljene životinje се морaju сместити у изолацију у циљу потврђивања њиховог безбедног здравственог статуса, као и аклиматизације на нове смештајне услове, при чему се мора водити рачуна о локацији одговарајуће стале и дужини трајања изолације. Дужина трајања изолације је обрнуто сразмерна здравственом статусу домаћег стада, што значи да ако је он виши и контрола мора бити строжија и траје обично 4 недеље, али је препоручљивије да траје шест недеља (Hristov i sar., 2007).

3. Здравствени статус запата

Одржива заштита здравственог стања и успешна производња су могући само ако у запату нема узрочника инфективних болести и чинилаца који доводе до појаве тежњавија. Наћин употребе, чувања, одржавања и руковања терапеутским средствима, instrumentима, semenом, као и употреба средстава за једнократну употребу свакaко утићу на постизање задовољавајућег здравственог стања свих категорија говеда и свинја (Stanković i sar., 2015b).

4. Однос особља према опреми

Узроци инфективних обољења се могу преносити и посредно путем опреме. У циљу редукције ширења агенаса опремом предузима се следеће: прање руку пре свaког

ulaska u segment farme i nakon rada sa bolesnim grlima, nošenje zaštitnih rukavica. Odvojena upotreba opreme za rad sa hranom i stajnjakom, jednokratna upotreba igala, sterilizacija instrumenata, markiranje i pranje radne odeće odgovarajućim deterdžentima (Hristov i sar., 2007).

5. Kontrola kretanja i prometa

Kontrola kretanja vozila, ljudi i životinja sa farme i prema njoj mora biti sastavni deo tehnologije proizvodnje i mora biti osmišljena tako da spreči ili smanji na najmanju moguću meru kontaminaciju stada, hrane i opreme (Hristov i sar., 2007). U praksi se vrlo često zanemaruju neki važni elementi kontrole kretanja, koji se odnose na dezobarijeru i proceduru pri ulasku na farmu vozila i stranih lica, iako je sve to predviđeno protokolom farme. Dezobarijere su redovno nenatkrivene, izložene atmosferskim i površinskim vodama, a rastvor se ne menja dovoljno često koliko to zahteva frekvencija saobraćaja.

6. Režim poseta

U cilju smanjenja mogućnosti rasejavanja kontaminanata preduzima se informisanje posetilaca i vozača o metodama zaštite i insistiranje na njihovoj saradnji u minimiziranju mogućnosti kontaminacije, sprečavanju ulaska posetilaca u prostore za smeštaj i ishranu, postavljanje znakova za zabranjen ulaz, s brojem telefona za kontakt na ulaz farme (Hristov i sar., 2007).

7. Kontrola hrane i opreme za hranjenje

Pravilnim skladištenjem hrana se štiti od kontaminacije. Hranu za različite kategorije i sisteme treba označiti i razvrstati u cilju izbegavanja propusta. Takođe, treba pratiti kvalitet vode i obezbediti odgovarajući sistem za napajanje. Ukoliko se hrana nabavlja, najbolje je kupovati je od proizvođača s kontrolisanim režimom proizvodnje, kvaliteta i biološke bezbednosti (Hristov i sar., 2007).

8. Izdubravanje

Položaj deponije za stajnjak u okviru farme i ocena organizacije izdubravanja pružaju veliki broj informacija o nivou biосигурности на farmi i svesti zaposlenih (Hristov i sar., 2007).

9. Uklanjanje leševa uginulih životinja

Veoma je važno da se svi leševi uginulih životinja što pre i na odgovarajući način uklone s farme (Hristov i sar., 2007).

10. Odnos prema drugim životinjama na farmi

Iako to nije poželjno, nekada se ne može zanemariti želja vlasnika farmi da na farmi imaju pse, mačke ili konje. U tom smislu, treba uskratiti pristup navedenim životinjama u delove farme u kojima su smeštena proizvodna grla (Hristov i sar., 2007).

11. Kontrola ptica i glodara

Kontrola ptica ima svoje značenje na komercijalnim farmama svinja. Ptice (golubovi, vrapci, čvorci i laste) mogu biti nosioci infektivnog materijala na nogama ili u sistemu za varenje. Stoga se preporučuje zatvaranje rupa pogodnih za pravljenje gnezda; postavljanje mreža na prozore i otvore za ventilaciju, zatvaranje otvora na silosima i pokrivanje rubova ispod krovišta i streha pogodnih za gnezda i ležanje (Hristov i sar.,

2007). Контрола популација глодара је обавезан део svakог плана биосигурности, па се у том циљу предузима следеће: изградња објеката у које глодари не могу да продру, затварање безбедних места за скривање, елиминисање могућности исхране и напajања и уништавање постојећих популација тровањем, задињавањем и замкама.

12. Санитација

Санитација има значење за комерцијалне фарме свинја. Појам санитације се односи на одржавање хигијене, чишћење и дезинфекцију материјала, људи и опреме који улазе на фарму и хигијену људи и опреме на фарми (Hristov i sar., 2007).

Евалуација контролисаних фарми

Данас постоје бројне методе евалуације односно процене биосигурносних мера на фарми свинја уз могућност својеврсног бодовања и статистичке обраде података. У оцени индикатора биосигурности користимо и скалу од 0 до 5. Такође се понекад користи и SWOT анализа (снага, слабост, прилике, претње). Тако на пример, на основу оцене индикатора и SWOT анализе смо установили да на већем броју фарми свинја је присуство респираторних инфекција. Установљено је присуство *Mycoplasma hyopneumoniae* и *Actinobacillus pleuropneumoniae*. На нашим контролисаним фармима учесталост наведених узрочника је била висока. Један од озбиљнијих здравствених проблема на фармима је присуство PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome). На контролисаним фармима индикатор здравственог стања је добио ниску оцелу из разлога јер су на већини прегледаних фарми установљени неадекватан смештај, исхрана и спровођење терапије, као и одсуство спровођења превентивних мера. Као резултат таквог стања били су присутни значајни губици прасади на сиси, као и у категорији залућене прасади. Економски проблем представљају губици у категорији това, који су мањи у односу на губитке прасади на сиси и одбијене прасади (Bojkovski i sar., 2022; Bojkovski i sar., 2023). Поред наведеног, данас велики број аутора наводи да су зоохигијенски услови на фарми један од начина како спречити присуство патогених агенаса узгојних или инфективних болести, односно да је спровођење зоохигијенских мера основ да индикатори биосигурности буду добро оцењени (Asaj, 2003; Stanković i sar., 2009; Krnjić, 2010). Као основа за профилактичке мере, врло често се спроводи имунопрофилакса, која у основи нема законску обавезу, али је врло значајна с економског аспекта. Међутим, данас о вакцинацији одлучује фарма, односно спроводи се на лични избор власника, што и није добро када се слагледава са стручног аспекта.

Имајући у виду различитости које постоје у оквиру постојеће фармске производње у Републици Србији, свака комерцијална али и породична фарма треба да има разрађен и усвојен сопствени план и протокол о примени биосигурносних мера, у складу с постојећом инфраструктуром и капацитетима у производном погону. Од посебног је значаја и да лица која раде на фарми треба да буду упозната с биосигурносним мерима, односно свим превентивним и контролним мерима које се спровode на фарми у циљу спречавања уношења узрочника нарочито опасних заразних болести свинја. Стога, у циљу ефикасне примене биосигурносних мера, неопходан је и континуирани рад на едукацији и

informisanosti svih lica uključenih direktno i/ili indirektno u proizvodni proces na farmi svinja (farmeri, zaposlena lica-radnici na farmi, stručna lica).

Na farmama visoko mlečnih krava koje su bile uključene u projektni zadatak, kod teladi su izolovane sledeće bakterije: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella spp.*, *Histophilus somni*, *Haemophilus spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*. Najznačajniji uzročnici gastrointestinalnih oboljenja kod teladi su enteropatogeni sojevi *E. coli* i *C. perfringens*. Ulogu u nastanku oboljenja imaju samo oni sojevi *E. coli* koji su sposobni da postanu dominantni u crevnoj flori i progresivno se razmnožavaju u prednjim partijama tankih creva. Gastrointestinalna oboljenja izazvana klostridijama naročito su karakteristična za telad mlađu od tri nedelje, koja su prijemčivija od odraslih jedinki. Gastrointestinalna oboljenja virusne etiologije (*Rotavirusi*) nastaju kada je uticaj virulence određenog soja virusa potisnuo lokalni crevni imunitet i redukovao crevnu bakterijsku floru. Virusi se ne smatraju primarnim uzročnicima oboljenja, čak i kad se izoluju iz fecesa dijarejične teladi. Prisustvo enteropatogenih sojeva *E. coli* pospešuje njihovu patogenost, a neadekvatni zoohigijenski uslovi i neredovno izdubhravanje pogoduju zadržavanju patogenih mikroorganizama iz fecesa u objektima (Bojkovski i sar., 2022; Ninković i sar., 2023). Oboljenja teladi su najčešće multifaktorijalne etiologije, a kao najznačajniji zdravstveni problemi na farmama visoko mlečnih krava izdvajaju se oboljenja organa za disanje i varenje. U nastanku infektivnih oboljenja različite etiologije, veliki značaj imaju nepovoljni higijenski i mikroklimatski uslovi smeštaja i neadekvatni tehnološki postupci u odgoju. Intenzivni uzgoj teladi zahteva kontinuirano praćenje zdravstvenog stanja teladi i adekvatnu primenu veterinarsko-profilaktičkih, higijensko-sanitarnih i zootehničkih mera (Ninković i sar., 2023).

ZAKLJUČAK

U sagledavanju prikazanih indikatora nivoa biosigurnosti treba imati u vidu da svest ljudi o stvarnoj potrebi zaštite proizvodnje u celini i stalan rad na uklanjanju pretnji po biosigurnost predstavlja ključ uspeha u osmišljavanju i primeni planova biosigurnosti za svaku konkretnu situaciju i farmu. Vlasnici farmi imaju najveću odgovornost u zaštiti sopstvenih zapata. Takođe, zaposleni na farmi, kao i posetioci, moraju biti svesni svoje uloge u očuvanju bezbednog zdravstvenog statusa farme. Biosigurnost treba razmatrati kao osnovu svih preventivnih i zdravstvenih programa u kontroli, suzbijanju i iskorenjivanju bolesti svinja i говеда. Treba istaći da je primena biosigurnosnih mera na farmama svinja i говеда danas najvažnija mera u sprečavanju potencijalnog unošenja i širenja patogenih mikroorganizama. Stoga, mere biosigurnosti moraju biti dobro definisane, praktične, funkcionalne i razumljive farmerima, odnosno odgajivačima говеда i svinja.

Zahvalnica

Rad je podrжан projektnim sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije („Razvoj i implementacija standarda dobrobiti i biosigurnosti u cilju unapređenja proizvodnje говеда и свинја, 2008-2011“, tehnološki projekti TR31071, 2011.2018, ugovor broj 451-03-9/2021-14/200143) i sredstvima bilateralnog projekta Republike Srbije i Republike Slovenije (Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, Sektor za međunarodnu saradnju i evropske integracije, Republika Srbija, evidencioni br. 337-00-110 2023-05/48).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Alarcón L.V., Allepuz A., Mateu E. (2021): Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag.* 4;7(1):5.
- Asaj A. (2003): Higijena na farmi i u okolišu. Medicinska Naklada.
- Bojkovski J., Prodanov-Radulović J., Nedić S., Arsić S., Đurić M., Mitrović A., Žutić J. Kureljušić J., Pavlović I., Zdravković N., Kureljušić B., Angjelovski B., Aniță D. C., Aniță Oslbanu L., Aniță A. E., Prodanović R. (2023): Mycoplasmatic (enzootic) pneumonia of pigs as a health problem in fattening units. *Scientific papers Veterinary Medicine, Lucrari Stiintifice Seria Medicina Veterinaria*, 66(3):35-43.
- Bojkovski J. Zdravković N., Žutić J. Radanović O., Pavlović I., Prodanov-Radulović J., Arsić S., Nedić S., Angelovski B., Doboravljević I., Prodanović R., Nakov D., Đurić M. (2022): Bronchopneumonia as a health problem on pig farms (research review). *Lucrari stiintifice veterinaria*, LV3:5-13.
- Bojkovski J. (2015): Biosecurity on pig farms. Lambert Academic Publishing.
- Bojkovski J., Prodanov Radulović J., Vakanjac S., Becskei Z., Zdravković, N., Stanišić Lj., Đurić M., Nedić S., Dobrosavljević I., Maletić J. (2020): Najčešći propusti u obezbeđivanju biosigurnosti na farmi свинја. 11. Naučni simpozijum Reprodukciја домаћих животиња, Zbornik predavanja, 185-195.
- Bojkovski J., Prodanović R., Vujanac I., Nedić S., Relić R., Bojkovski D., Bugarski D., Ostojić-Andrić D., Pavlović I., Milanov D. (2017): Breeding disease and welfare calves on dairy farms tied breeding system. In 11th International symposium modern trends in livestock production, Proceedings, 365-377.
- Hristov S., Stanković B., Joksimović-Todorović M., Davidović V. (2007): Biosigurnosne mere na farmi говеда, doborobit životinja i biosigurnost na farmama. 1. Međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Zbornik radova, 259-269.
- Hristov S., Stanković B., Relić R. (2006): Higijenski standardi u uzgoju prasadi. 6. Simpozijum Uzgoj i zaštita zdravlja свинја, Zbornik radova, 17-20.
- Krnjajić J. (2010): Prikaz proizvodnje na nukleus farmi-Stara Pazova. Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija свинја, Zbornik radova.
-

- Ninković M., Zdravković N., Nikolić M., Pavlović M., Jezdimirović N., Zurovac Sapundžić Z., Bojkovski J. (2023): Rota virusna dijareja teladi pre i posle vakcinacije-iskustvo. 28 godišnje savetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BIH) sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova i kratkih sadržaja, 68-69.
- Ostojić-Andrić D., Hristov S., Petrović M., Pantelić V., Bojkovski J., Nikšić D., Mičić N. (2017): Dairy cows' welfare quality in different seasons – a welfare approach. In International symposium on Animal Science, 11th International Congress new Perspective and challenges of sustainable livestock production, Proceeding book, 302-303.
- Polaček V., Mirčeta J., Prodanov-Radulović J. (2021): Key Risk Factors and Impact of African Swine Fever Spreading On Pig Production In Serbia. *Acta Vet.*, 71(4):371-391.
- Prodanov-Radulović J., Đurđević B., Petrović J., Mirčeta J., Polaček V. (2022): African swine fever: A biosecurity challenge for domestic pig production in Serbia. *Arch. Vet. Med.*, 15(2):21-38.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Milošević-Stanković I., Maksimović N. (2015b): Respiratory disorders and biosecurity on dairy farms. In 4th International Congress New Perspectives and challenges of sustainable livestock production, Proceedings book, 414-427.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Tolimir N. (2016): Relationship between claws treatment and somatic cell count in milk of Simmental dairy cows. In International Symposium on Animal Science, Proceedings book, 319-326.
- Stanković B., Hristov S., Bojkovski J., Zlatanović Z., Maksimović N., Todorović-Joksimović M., Davidović V. (2011): The possibility of dairy farms isolation assessment – biosecurity aspect. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(4):1425-1431.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Maksimović N. (2015a): Sustainability and efficiency of dairy Farms Biosecurity Plans, *Agroknowledge Journal*, 16(4):437-453.
- Stanković B., Hristov S., Petrujkić T., Todorović-Maksimović M., Davidović V., Bojkovski J. (2008): Biosigurnost na farmi svinja u svakodnevnoj praksi. *Biotehnologija u stočarstvu*, 24:601-608.
- Stanković B., Hristov S. (2009): Najčešći propusti u obezbeđenju biosigurnosti na farmama говеда и свинја. Savetovanje Instituta PKB Agroekonomik, Zbornik naučnih radova, 15(3-4):103-109.
- WQ. (2009): Assessment protocol for cattle. Welfare Quality, ASG Veehouderij BV.
-

DOI 10.7251/VETJEN2401229B

UDK 636.2.09+636.083.312]:579.842.11

Review Scientific Paper

THE IMPORTANCE OF ASSESSMENT AND CONTINUOUS CONTROL OF BIOSECURITY ON CATTLE AND PIG FARMS

Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Sreten NEDIĆ¹, Sveta ARSIĆ¹, Aleksandra MITROVIĆ¹, Ivan PAVLOVIĆ², Milan NINKOVIĆ², Jasna PRODANOV-RADULOVIĆ³

¹University in Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

²Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

³Scientific Veterinary institute Novi Sad, Novi Sad, Serbia

*Corresponding author: Jovan Bojkovski, jovan_bojkovski@yahoo.com

Summary

Biosecurity, welfare, good production practice and risk analysis are very important elements for intensive production on farms of high yielding dairy cows and pigs. The planned application of biosecurity measures is crucial in protecting the health of cattle and pigs and for the production success. It is recommended that employees' awareness of improving biosecurity constantly raise, that there is an active attitude towards existing risks, and that the measures taken are the key to success in designing and preparing biosecurity plans for each specific situation i.e. the farm. It is generally known that oversights, omissions and mistakes in maintaining the required level of biosecurity usually lead to the emergence of diseases, decline in production, death and economic loss. Therefore, by applying more preventive measures to the health care of cattle and pigs, the concept of profitable production on farms can be fulfilled. It should be emphasized that the application of biosecurity measures on cattle and pig farms is the most important measure to prevent the potential introduction and spread of pathogens. Therefore, biosecurity measures must be well defined, practical, functional and understandable to farmers, i.e. cattle and pig breeders. This paper presents an evaluation of the permanent biosecurity control on cattle and pig farms, as part of the implemented project tasks.

Key words: biosecurity, health care, cattle, pig.

INTRODUCTION

Biosecurity on farms

Nowadays, in general, there are numerous definitions of biosecurity or biosecurity measures, which can be considered from different aspects as well as for different production systems. However, all definitions have in common that biosecurity includes a set of measures and procedures whose main goal is to reduce the risk of introduction,

occurrence and spread of various disease agents in or on a pig farm, regardless of the production levels (Alarcón et al. 2021 ; Prodanov-Radulović et al., 2022).

When considering the state of biosecurity at the farm level, one should simultaneously take into account related, but to some extent different concepts: biosecurity plans, risk assessment at critical control points and plans for emergency situations. Biosecurity plans are crucial for the prevention of production and infectious diseases. Also, biosecurity plans are crucial in preventing unwanted situations and improving business (Stanković et al., 2015a; Stanković et al., 2016; Hristov et al., 2006, Poláček et al., 2021).

Intensive production in cattle and pig farming implies a large concentration of animals in a relatively small area, which is why it is necessary to apply certain measures in order to preserve the health of cattle and pig herds, prevent the introduction and spread of production and infectious diseases in the herd and preserve production (WQ, 2009; Bojkovski, 2015; Bojkovski et al., 2017; Bojkovski et al., 2020). The application of biosecurity plans implies constant activity to create and preserve a friendly environment for the life of animals and their production, primarily in terms of preventing the introduction and spread of infectious disease agents, and it is important since the market for beef, dairy products and pork increasingly takes an international character (Stanković et al., 2011).

Many solutions that are applied on high-yielding dairy and pigs farms, in order to improve profitability, increase efficiency and safety of production, often cause discomfort, pain and stress, i.e. distress of animals, while preventing their natural instinctive behavior, which is reflected to the greatest extent in the economic results of production (Hristov et al., 2018). Overlooks, omissions and errors in maintaining the required level of biosecurity usually lead to the appearance of diseases, production loss, death and loss of income, thereby endangering the survival of entire herds of cattle and pigs (Hristov et al., 2007).

The concept of biosecurity implies three main factors:

1. Isolation, which prevents the contact of individuals from the controlled ambience and the environment, and refers to newly acquired animals, contacts between existing groups of cattle divided by age and/or into production groups, as production operations that are repeated in several groups of animals, such as feeding, loading, etc.
 2. Traffic control, which includes monitoring the movement of vehicles, people and all animals from and to the farm and must be designed to prevent or minimize the risk of pathogens entering the farm and contaminating food and equipment.
 3. Sanitation, which refers to the disinfection of materials and equipment entering the farm and the hygiene of people and equipment on the farm (Hristov et al., 2007).
-

Assessment of on-farm biosecurity settings

There is no single biosecurity plan for all dairy and pig farms. Achieving the required level of biosecurity on a dairy farm implies a plan that was created by analyzing the current epizootiological situation in the area where the farm is located (Stanković et al., 2008; Stanković et al., 2011).

Numerous limiting factors make it difficult to reach the required level of herd health protection and production success. The size of the farm and the production level understandably greatly limit the scope and quality of the measures taken, which can also be said for the intensity of production. This practically means that economic profitability must have a decisive role in determining the goals that need to be achieved by implementing a biosecurity plan, or at least certain biosecurity measures, expressed in the form of good husbandry practices, good veterinary practices or HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) oriented plans. (Ostojić-Andrić et al., 2017).

Failures in the application of certain biosecurity measures were observed on the cattle and pig farms that were included in the project research. The aim of this review, which was part of the project tasks, is to provide information related to the improvement or introduction of biosecurity measures on farms of high yielding dairy cows and pigs.

Biosecurity indicators on the farm

13. Isolation as an element of biosecurity on the farm

Farm location is a key element of a sustainable biosecurity plan. Isolation of facilities in relation to potential sources of pathogenic microorganisms is an important measure of protection, especially when it comes to airborne infections (Stanković et al., 2015b). This means that the location is determined by a number of related factors, of which distance is the easiest to measure, but it also includes the type and size of the farm, prevailing winds, humidity, and more. The importance of the green protective belt around the farms is almost regularly neglected (Hristov et al., 2007; Stanković et al., 2015b).

14. Quarantine

Newly acquired animals must be placed in isolation in order to confirm their safe health status, as well as acclimatization to the new housing conditions, taking into account the location of the appropriate barn and the duration of the isolation. The duration of isolation is inversely proportional to the health status of the domestic herd, which means that if it is higher, the control must be stricter and usually lasts 4 weeks, but it is more recommended to last six weeks (Hristov et al., 2007).

15. Health status of the herd

Sustainable health protection and successful production are possible only if there are no causative agents of infectious diseases and factors that lead to the appearance of technopathies. The way of use, storage, maintenance and handling of therapeutic agents, instruments, semen, as well as the use of single-use agents certainly affect the achievement of a satisfactory health condition of all categories of cattle and pigs (Stanković et al., 2015b).

16. How the staff handle with equipment

The causative agents of infectious diseases can also be transmitted indirectly through equipment. In order to reduce the spread of agents with equipment, the following is undertaken: hand washing before each entry into the farm segment and after working with diseased animals, wearing protective gloves. Separate use of equipment for working with food and manure, single use of needles, sterilization of instruments, marking and washing of clothes with appropriate detergents (Hristov et al., 2007).

17. Movement and traffic control

Control of the movement of vehicles, people and animals from and to the farm must be an integral part of production technology and must be designed to prevent or minimize contamination of herds, food and equipment (Hristov et al., 2007). In practice, some important elements of movement control, related to the barrier and procedure for entering the farm for vehicles and foreign persons, are often neglected, although all of this is provided in the farm's protocol. Desobarriers are regularly uncovered, exposed to atmospheric and surface water, and the solution is not changed often enough as required by the frequency of traffic.

18. Visiting regime

In order to reduce the possibility of contaminant dispersion, it is necessary to inform visitors and drivers about protection methods and to insist on their cooperation in minimizing the possibility of contamination, preventing the entry of visitors into accommodation and eating areas, placing signs for prohibited entry, with a contact phone number at the entrance of the farm (Hristov et al., 2007)

19. Control of food and feeding equipment

Proper storage protects food from contamination. Food for different categories and systems should be labeled and sorted in order to avoid omissions. Also, the quality of water should be monitored and a suitable water supply system should be provided. If food is purchased, it is best to buy it from producers with a controlled regime of production, quality and biological safety (Hristov et al., 2007).

20. Manure management

The location of the manure dump within the farm and the evaluation of the manure treatment provide a large amount of information about the level of biosecurity on the farm and the awareness of employees (Hristov et al., 2007).

21. Removal of carcasses of dead animals

It is very important that all carcasses are removed from the farm as soon as possible and in an appropriate manner (Hristov et al., 2007).

22. Relation to other animals on farm

Although it is not desirable, sometimes the desire of farm owners to have dogs, cats or horses on the farm cannot be ignored. In this sense, the mentioned animals should be denied access to the parts of the farm where the production animals are located (Hristov et al., 2007).

23. Bird and rodent control

Bird control has its meaning on commercial pig farms. Birds (pigeons, sparrows, starlings and swallows) can carry infectious material on their feet or in their digestive system. It is therefore recommended to close holes suitable for making nests; placing nets on windows and ventilation openings, closing openings on silos and covering edges under roofs and eaves suitable for nests and laying (Hristov et al., 2007). Rodent population control is a mandatory part of any biosecurity plan and the following is undertaken: construction of facilities where rodents cannot penetrate, closure of safe hiding places, elimination of feeding and drinking opportunities, and destruction of existing populations by poisoning, fumigation and traps.

24. Sanitation

Sanitation has implications for commercial pig farms. The term sanitation refers to the maintenance of hygiene, cleaning and disinfection of materials, people and equipment entering the farm and the hygiene of people and equipment on the farm (Hristov et al., 2007).

Evaluation of inspected farms

Nowadays, there are numerous methods of evaluation, i.e. assessment of biosecurity measures on pig farms, with the possibility of a scoring and statistical data processing. We also use a scale from 0 to 5 in the assessment of biosecurity indicators. SWOT analysis (strength, weakness, opportunities, threats) is also sometimes used. For example, based on the indicator's assessment and SWOT analysis, we found that respiratory infections are present in a large number of pig farms. The presence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* was established. On farms that we inspected, the frequency of the above pathogens was high. One of the more serious health problems on farms is the presence of PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome). On the inspected farms, the health condition indicator was low due to the fact that on the majority of inspected farms, inadequate accommodation, nutrition and implementation of therapy, as well as the absence of implementation of preventive measures, were found. As a result of such a situation, there were significant losses of suckling piglets, as well as loss in the category of piglets that were weaned. The economic problem is represented by the losses in the fattening category, which are smaller compared to the losses of suckling and weaned piglets (Bojkovski et al., 2022; Bojkovski et al., 2023). In addition to the above, a large number of authors state that zoohygiene conditions on the farm are one of the ways to prevent the presence of pathogenic agents of production or infectious diseases, that is, that the implementation of zoohygiene measures is the basis for biosecurity indicators to be well evaluated (Asaj, 2003; Stanković et al., 2009; Krnjaić, 2010). As a basis for prophylactic measures, immunoprophylaxis is very often carried out, which basically has no legal obligation, but is very important from an economic point of view. However, vaccination is decision of the farm management, that is, it is carried out as the owner's personal choice, which is not good when viewed from a professional perspective.

Bearing in mind the differences that exist within the existing farm production in the Republic of Serbia, every commercial as well as family farm should have its own plan and protocol on the application of biosecurity measures developed and adopted, in accordance with the existing infrastructure and capacities in the production plant. It is of particular importance that persons working on the farm should be familiar with biosecurity measures, that is, all preventive and control measures implemented on the farm in order to prevent the introduction of the causative agents of particularly dangerous infectious diseases of pigs. Therefore, in order to effectively apply biosecurity measures, continuous work on education and information of all persons involved directly and/or indirectly in the production process on the pig farm (farmers, farm workers, professionals) is necessary.

On high-yielding dairy farms that were included in the project task, the following bacteria were isolated from calves: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella spp.*, *Histophilus somni*, *Haemophilus spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*. The most important causative agents of gastrointestinal diseases in calves are enteropathogenic strains of *E. coli* and *C. perfringens*. Only those strains of *E. coli* that are capable of becoming dominant in the intestinal flora and progressively reproduce in the front parts of the small intestines play a role in the development of the disease. Gastrointestinal diseases caused by clostridia are especially characteristic of calves younger than three weeks, which are more susceptible than adults. Gastrointestinal diseases of viral etiology (*Rotaviruses*) occur when the influence of the virulence of a certain strain of virus suppresses the local intestinal immunity and reduces the intestinal bacterial flora. Viruses are not considered to be the primary cause of disease, even when isolated from the feces of diarrheal calves. The presence of enteropathogenic strains of *E. coli* enhances their pathogenicity, and inadequate animal hygiene conditions and irregular mature management favor the retention of pathogenic microorganisms from feces in facilities (Bojkovski et al., 2022; Ninković et al., 2023). Diseases of calves are most often of multifactorial etiology, and the most significant health problems on farms with high-yielding cows are diseases of the respiratory and digestive organs. Unfavorable hygienic and microclimatic housing conditions and inadequate technological procedures in breeding are of great importance in the emergence of infectious diseases of various etiologies. Intensive breeding of calves requires continuous monitoring of the health status of calves and adequate application of veterinary-prophylactic, hygienic-sanitary and zootechnical measures (Ninković et al., 2023).

CONCLUSION

Regarding the biosecurity level indicators, it should be known that people's awareness to protect production as a whole and constant work on removing threats to biosecurity is the key to success in designing and implementing biosecurity plans for each specific situation and farm. Farm owners have the greatest responsibility in protecting their own herds. Also, farm employees, as well as visitors, must be aware of their role in

maintaining the safe health status of the farm. Biosecurity should be considered as the basis of all preventive and health programs in the control, suppression and eradication of swine and cattle diseases. It should be emphasized that the application of biosecurity measures on pig and cattle farms is the most important measure in preventing the potential introduction and spread of pathogenic microorganisms. Therefore, biosecurity measures must be well defined, practical, functional and comprehensible to farmers, i.e. cattle and pig breeders.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia ("Development and implementation of welfare and biosecurity standards in order to improve the production of cattle and pigs, 2008-2011", technological projects TR31071, 2011.2018, contract No. 451-03-9/2021-14/200143) and by the funds from bilateral project between Republic of Serbia and Republic of Slovenia (Ministry of Science, Technological Development and Innovation, Sector for International Cooperation and European Integration, Republic of Serbia, registration no. 337-00-110 2023-05/48).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest

REFERENCES

- Alarcón L.V., Allepuz A., Mateu E. (2021): Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag.* 4;7(1):5.
- Asaj A. (2003): Hygiene on the farm and in the environment. Medicinska Naklada.
- Bojkovski J., Prodanov-Radulović J., Nedić S., Arsić S., Đurić M., Mitrović A., Žutić J. Kureljušić J., Pavlović I., Zdravković N., Kureljušić B., Angjelovski B., Aniță D. C., Aniță Oslbanu L., Aniță A. E., Prodanović R. (2023): Mycoplasmatic (enzootic) pneumonia of pigs as a health problem in fattening units. *Scientific papers Veterinary Medicine, Lucrari Stiintifice Seria Medicina Veterinaria*, 66(3):35-43.
- Bojkovski J. Zdravković N., Žutić J. Radanović O., Pavlović I., Prodanov-Radulović J., Arsić S., Nedić S., Angelovski B., Doboravljević I., Prodanović R., Nakov D., Đurić M. (2022): Bronchopneumonia as a health problem on pig farms (research review). *Lucrari stiintifice veterinaria*, LV3:5-13.
- Bojkovski J. (2015): Biosecurity on pig farms. Lambert Academic Publishing.
- Bojkovski J., Prodanov Radulović J., Vakanjac S., Becskei Z., Zdravković, N., Stanišić Lj., Đurić M., Nedić S., Dobrosavljević I., Maletić J. (2020): The most common failures in ensuring biosecurity on a pig farm. In 11. Scientific Symposium Reproduction of Domestic Animals, Proceedings, 185-195.
- Bojkovski J., Prodanović R., Vujanac I., Nedić S., Relić R., Bojkovski D., Bugarski D., Ostojić-Andrić D., Pavlović I., Milanov D. (2017): Breeding disease and welfare
-

- calves on dairy farms tied breeding system. In 11th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Proceedings, 365-377.
- Hristov S., Stanković B., Joksimović-Todorović M., Davidović V. (2007): Biosecurity measures on cattle farms, animal welfare and biosecurity on farms. In 1. International conference on welfare and biosecurity on farms in Serbia, Proceedings, 259-269.
- Hristov S., Stanković B., Relić R. (2006): Hygienic standards in raising piglets. In 6th Symposium Breeding and Health Protection of Pigs, Proceedings, 17-20.
- Krnjaić J. (2010): Production presentation at the nucleus farm - Stara Pazova. In Health Care, Selection and Reproduction of Pigs, Proceedings.
- Ninković M., Zdravković N., Nikolić M., Pavlović M., Jezdimirović N., Zurovac Sapundžić Z., Bojkovski J. (2023): Rotavirus diarrhea in calves before and after vaccination - experience. In 28. Anniversary Annual Counselling of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (Bosnia and Heryegovina) with international participation, Proceedings and short contents, 68-69.
- Ostojić-Andrić D., Hristov S., Petrović M., Pantelić V., Bojkovski J., Nikšić D., Mičić N. (2017): Dairy cows' welfare quality in different seasons – a welfare approach. In International symposium on Animal Science, 11th International Congress new Perspective and challenges of sustainable livestock production, Proceeding book, 302-303.
- Polaček V., Mirčeta J., Prodanov-Radulović J. (2021): Key Risk Factors and Impact of African Swine Fever Spreading On Pig Production In Serbia. *Acta Vet.*, 71(4):371-391.
- Prodanov-Radulović J., Đurđević B., Petrović J., Mirčeta J., Polaček V. (2022): African swine fever: A biosecurity challenge for domestic pig production in Serbia. *Arch. Vet. Med.*, 15(2):21-38.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Milošević-Stanković I., Maksimović N. (2015b): Respiratory disorders and biosecurity on dairy farms. In 4th International Congress New Perspectives and chalenges of sustanable livestock production, Proceedings book, 414-427.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Tolimir N. (2016): Relationship between claws treatment and somatic cell count in milk of Simmental dairy cows. In International Symposium on Animal Science, Proceedings book, 319-326.
- Stanković B., Hristov S., Bojkovski J., Zlatanović Z., Maksimović N., Todorović-Joksimović M., Davidović V. (2011): The possibility of dairy farms isolation assessment – biosecurity aspect. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(4):1425-1431.
- Stanković B., Hristov S., Zlatanović Z., Bojkovski J., Maksimović N. (2015a): Sustainability and efficiency of dairy Farms Biosecurity Plans, *Agroknowledge Journal*, 16(4):437-453.
-

- Stanković B., Hristov S., Petrujkić T., Todorović-Maksimović M., Davidović V., Bojkovski J. (2008): Biosecurity on pig farms in everyday practice. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 24:601-608.
- Stanković B., Hristov S. (2009): The most common failures in dairy and pig farms biosecurity ensuring. In Counselling of the Institute PKB Agroekonomik, Proceedings, 15(3-4):103-109.
- WQ. (2009): Assessment protocol for cattle. Welfare Quality, ASG Veehouderij BV.
-

УПУТСТВО АУТОРИМА И РЕЦЕНЗЕНТИМА

Пријављивање

Подношењем рукописа аутори гарантују да је њихов достављени рад часопису *Ветеринарски журнал Републике Српске* њихово оригинално дјело, да раније није објављен, да се не разматра за објављивање на другим мјестима, као и да су његово објављивање одобрили сви коаутори, ако их је било, као и одговорни органи, прећутно или експлицитно, у установи у којој је дјело изведено. Аутори су искључиво одговорни за садржај својих поднесака, исправност експерименталних резултата и морају да се увјере да имају дозволу свих укључених страна да податке јавно објаве. Аутори који желе да укључе податке или текстуалне одломке који су већ објављени на другим мјестима, морају да добију дозволу од носилаца ауторских права и да укључе доказе да је таква дозвола дата приликом подношења њихових радова. Претпостављаће се да било који материјал примљен без таквих доказа потиче од аутора.

Пријављивањем рукописа *Ветеринарском журналу Републике Српске* аутори се слажу с одредбама и условима часописа. Сва преписка је, укључујући и обавјештење о одлуци уредника и захтјевима за рецензију, путем електронске поште (e-mail). Текст рукописа се пише на једном од језика у службеној употреби у Босни и Херцеговини и добром енглеском језику (америчка или британска употреба је прихваћена, али не и мјешавина ових). Уредник задржава право да измијени поднијете рукописе по одговарајућем стандарду формалног језика који је у службеној употреби у Босни и Херцеговини и енглеског језика. Рукописи се унапријед процјењују у уредништву како би се провјерило да ли испуњавају основне захтјеве за објављивање и стандарде квалитета. Они се такође провјеравају због плагијата. Аутори ће бити обавијештени путем е-поште о пријему поднеска. Само они рукописи који су у складу с упутством ауторима, могу бити прихваћени за рецензију. У супротном, рукописи ће бити враћени ауторима са запажањима и коментарима.

Процедура рецензије

Ветеринарски журнал Републике Српске нуди брзу online и штампану публикацију за све чланке који нису објављени на другим мјестима, а рецензија се води електронским путем. Од аутора се може тражити да дају контакт податке три потенцијална рецензента, али коначна одлука о избору рецензента почива на уредништву, без икакве обавезе да контактира било ког од рецензената које препоручује аутор. Уредник именује најмање два рецензента на препоруку чланова уредништва. Просљеђени рукописи се шаљу рецензентима заједно са упутствима за рецензију и пратећим обрасцима за оцјењивање рукописа. Прихватање рукописа се заснива на рецензијама и на коначним одлукама рецензената у вези са прихватљивошћу рукописа. Одлука рецензента је једна од следећих: “Прихватљиво за објављивање”, “Прихватљиво након исправки” или “Неприхватљиво за објављивање”. Ако постоји неусаглашеност у одлукама

између рецензената, уредник може послати рукопис другом рецензенту за додатне коментаре и даљу одлуку или ће рад бити одбијен. Имена рецензената се не преносе аутору и обрнуто (обострано слијепа рецензија). Очекује се да ће процес рецензије, генерално гледано, почети у року од двије недјеље од подношења рукописа, а да ће исправљени рукописи бити враћени у року од четири недјеље. Чланак се објављује на веб страни *Ветеринарског журнала Републике Српске*, на веб страни Агенције DOI Српска и као штампани примјерак издања.

КАТЕГОРИЈЕ И УСЛОВИ ЗА РУКОПИСЕ

Пажљиво прочитајте упутство. Рукопис који није припремљен у складу с упутством ауторима, неће бити прихваћен за разматрање. Рукопис мора бити откуцан коришћењем фонта Times New Roman 12 тачака са обостраним поравнавањем, линијама са једним размаком на страници А4 величине, са маргинама странице 3,0 цм (као MS Word files, .doc). Наслови текста треба да буду откуцани великим словима и кратким поднасловима, гдје је неопходно, само са почетним великим словом.

Ветеринарски журнал Републике Српске објављује радове из области ветеринарске медицине и сродних области, који су од широког интереса за циљну публику.

Категорије рукописа које објављује *Ветеринарски журнал Републике Српске* су:

- Оригинални научни рад
- Прегледни научни рад
- Кратко или претходно саопштење
- Приказ случаја.

Оригинални научни рад

Оригинални научни рад је рад у ком се први пут публикује текст о резултатима сопственог истраживања оствареног примјеном научних метода, које су текстуално описане и које омогућавају да се истраживање по потреби понови, а утврђене чињенице провјере. Оригинални научни рад садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, материјали и методе, резултати, дискусија, закључак, литература. Стил писања треба да буде сажет, али довољно јасан да читаоцима омогући репродукцију експерименталне методологије како је описано. Чланак мора представити јасну хипотезу и податке изражене према одговарајућем експерименталном дизајну. Дискусија узима у обзир познате податке или чињенице само у вези са добијеним резултатима и пружа основ за доношење закључака на основу резултата. Дискусија не укључује општа знања о истраживаној теми. Оригинални научни рад обично садржи највише 4000 ријечи и 30 референци.

Прегледни научни рад

Прегледни научни рад представља преглед најновијих радова о одређеном предметном подручју с циљем да се већ публиковане информације сажму, анализирају, евалуирају или синтетизују, те доноси нове синтезе које такође

обавезно укључују резултате сопственог истраживања аутора. Прегледни научни радови су обично по позиву. Аутори који препознају потребу и желе да пријаве рад су добродошли и савјетује им се да контактирају уредништво прије почетка писања како би се увјерили да слична тема већ није пријављена и дата неком аутору. Аутори треба да буду експерти за предмет прегледног научног рада, што доказују цитирањем својих објављених научних радова у пријављеном раду (најмање пет научних радова, који се баве истом темом као и пријављени чланак). Прегледни научни рад садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, закључак, литература. Прегледни научни рад обично садржи највише 4000 ријечи и 30 референци.

Кратко или претходно саопштење

Кратко или претходно саопштење је рад мањег обима или прелиминарног карактера, у којем се ради о сажетом изношењу резултата завршеног изворног истраживачког рада или чланка који је у настајању (енгл. Working Paper). Кратко или претходно саопштење садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, материјали и методе, резултати, дискусија, закључак, литература. Кратко саопштење обично садржи највише 3000 речи и 15 референци.

Приказ случаја

Приказ случаја је прилог у коме аутор процјењује правилност/неправилност неког научног или стручног рада, критеријума, поставке или полазишта, уз посебан нагласак на квалитет оцјењиваног рада. Приказ случаја садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, дискусија, литература. Приказ случаја обично садржи највише 2500 ријечи и 15 референци.

ИЗГЛЕД РУКОПИСА, СТИЛА И ОБЛИКА

Рукописи су подијелени у следеће уређене дијелове:

- Насловна страна
- Сажетак
- Кључне ријечи
- УВОД
- МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ
- РЕЗУЛТАТИ*
- ДИСКУСИЈА*
- ЗАКЉУЧАК
- Захвалница**
- Сукоб интереса
- ЛИТЕРАТУРА
- Наслови табела и / или Легенде слика
- Табеле и / или слике

* Резултати и дискусија могу да буду у једном поглављу

**** Није обавезно**

Насловна страна

Насловна страница укључује наслов рукописа, као и пуна имена и институционалне припадности свих аутора. Коресподентни аутор мора бити наведен.

Наслов: Наслов не садржи више од 110 знакова (укључујући размаке) и специфичан је за студију. Требао би бити разумљив широком спектру читалаца.

Аутори и припадности. То укључује имена, средње иницијале (ако се користе), презимена и припадности према следећем редослиједу: универзитет или организација / институција, град и држава за све ауторе. Надређени бројеви (1,2,3) користе се у случајевима када су аутори из различитих институција.

Коресподентни аутор. Један од аутора мора бити означен као коресподентни аутор (пored имена аутора додати симбол *). Мора се навести име, презиме и e-mail коресподентног аутора.

Сажетак

Сажетак садржи до 250 ријечи. Дијелови кратког садржаја не смију бити одвојени насловима него само новим пасусом.

Структурисан сажетак обавезан је за *оригинални научни рад* и *кратко или претходно саопштење* и подијељен је у следеће дијелове: увод, материјали и методе, резултати и закључак. Коришћене технике морају се поменути без уласка у методолошке детаље, а најважнији налази морају се резимирати.

Сажетак за *прегледни научни рад* је структурисан и подијељен на следеће дијелове: позадина, обим и приступ, кључни налази и закључци.

Приказ случаја не захтијева структурисан сажетак, али он укључује резиме случаја.

Цитати, табеле, специјалне скраћенице и нивои значајности (нпр. $P < 0,05$) нису укључени у сажетак.

Кључне ријечи

Испод кратког садржаја мора се навести три до пет кључних ријечи по абecedном реду, избјегавајући опште, појмове у множини и више појмова (нпр. „И“, „од“). Ове кључне ријечи ће се користити за индексирање.

УВОД

У овом дијелу треба указати на суштину проблема и сврху студије. Кључне аспекте објављене литературе и истраживања требало би прегледати с циљем да се укаже на то зашто се овај рукопис сматра оригиналним доприносом тренутним научним сазнањима. Треба избегавати детаљан опис литературе или резиме резултата. Последњи дио увода мора да садржи специфичне циљеве студије. Увод не прелази 400 ријечи.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Овај дио укључује, према потреби, опис дизајна студије, експерименталних животиња, аналитичких метода и статистичких анализа. Утврдите методе и поступке са довољно детаља да омогуће другима да репродукују студију. Ако су методе широко познате, нису описане, али се морају навести одговарајуће референце. За нове методе треба укључити протоколе за методу. Аутори морају пружити референце за успостављене методе, укључујући статистичке методе. Наведите било који општи рачунарски програм који се користи. Идентификујте све лијекове и хемикалије који се користе са генеричким или хемијским именима, дозама и начином примјене. Наведите произвођача, број производа, град и државу, где је то могуће. Дајте етичку изјаву о добробити животиња ако је примјењиво.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати су представљени у логичном редослиједу и паралелно са методама (за сваку методу треба да постоји резултат), користећи табеле и / или слике без дуплирања резултата између ова два формата. Да би се побољшала јасноћа, ово поглавље може се подијелити на подпоглавља, свако с концизним поднасловом, које пружа детаље о налазима који су потребни у прилог закључцима из рукописа.

ДИСКУСИЈА

О резултатима треба разговарати и повезати их са другим релевантним студијама и тренутним сазнањима тамо где је то потребно. Међутим, дискусија се не користи за сумирање тренутног знања. Дискусија треба јасно да идентификује главне закључке студије. Аутори треба да пруже јасно објашњење важности и релевантности ових закључака. Све нове информације треба разликовати од претходних налаза и могу се створити релевантне хипотезе.

ЗАКЉУЧАК

Закључак се састоји од кратке интеграције резултата који се директно односе на наведене циљеве студије и изјаве о практичним импликацијама резултата. Закључци су повезани са циљем студије, избегавајући неквалификоване изјаве и закључке који нису поткријепљени вашим подацима. Ово поглавље не би требало да прелази један кратак одломак. Не резимирајте дискусију или тренутно знање у овом поглављу.

Захвалница

Извор финансирања студије може бити наведен у овом поглављу. У овом поглављу могу се поменути сви они који су дали значајан допринос студији у погледу дизајна, извођења, анализе или израде / ревизије рукописа, али не одговарају критеријумима за ауторство.

Сукоб интереса

Сукоб интереса постоји када на тумачење података или презентацију информација може утицати лични или финансијски однос с људима или организацијама. Од аутора се тражи да попуне изјаву о сукобу интереса. Сви пријављени сукоби интереса биће наведени на крају објављених чланака. Тамо гдје аутор не наводи сукоб интереса, навешће се „Аутор (и) изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

Потребно је обезбиједити да свака референца наведена у тексту буде присутна и на списку литературе (и обрнуто).

Препоручује се да референце не буду старије од 20 година и да преко 80% референци буде из научних часописа, а остало из других научних извора.

Цитати у тексту, као што су личне комуникације, необјављени подаци или у штампани, магистарски и мастер радови, подаци из анонимних извора, као и докторске дисертације које нису приређене као научне монографије, нису прихватљиви. Радови са научних скупова могу се цитирати само ако су објављени у цјелости. У текст треба уврстити само основне референце, а оне су ограничене на неопходни минимум. Наведите референце у тексту према презимену и години у загради (нпр. Ковачевић, 2014). У случају два аутора, користите „и“ (нпр. Стевановић и Недић, 2015). Скраћеница „и сар.“ мора се користити у свим случајевима гдје се наводи више од два аутора (нпр. Marasas и сар., 2016). Више референци унутар заграда у тексту наводи се обрнутим хронолошким редом (нпр. Стевановић и сар., 2016; Голић и Недић, 2015; Теодоровић, 2014). У случају да исти аутор има више публикација у истој години, поред године се додају додатне словне ознаке (Ђоковић и сар., 2008а; Петровић и сар., 2008б).

У случају помињања организација или стандарда користе се скраћенице (нпр. EFSA, 2016; ISO, 2017) а код закона и правилника термин пропис (нпр. Пропис, 2012).

Листа референци поредана је по абеди (помоћу алата за сортирање А-З на траци MS Word Home, ако је потребно) према презименима првих аутора.

Примјери:

Часописи:

Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.

Књиге, монографије и приручници:

Stockham L.S., Scott A. M. (2008): Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Blackwell Publishing, 415.

Тешић М., Недић Д. (2011): Менаџмент ветеринарске праксе. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, 286.

FDA (2006): Managing Food Safety: A Manual for the Voluntary Use of HACCP Principles for Operators of Food Service and Retail Establishments. Food and Drug

Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Књиге са ауторским поглављима:

Marasas W. F. O. (1996): Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology. Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries, L. B. Bullerman, Plenum Press, 118.

Закони и прописи:

Пропис (2013): Commission Regulation (EU) No 1019/2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. Official Journal of the European Union, L 282:46-47.

Пропис (2012): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну. Службени гласник Републике Српске, 109/12.

Научни скупови:

Vasilev D., Aleksic B., Tarbuk A., Dimitrijevic M., Karabasil N., Cobanovic N., Vasiljevic N. (2015): Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages sremiski and lemeski kulen. In the 58th International Meat Industry Conference (MeatCon2015), Procedia Food Science, 5:300-303.

Цитати са организацијама као ауторима:

EFSA (2016): Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzoic acid. European Food Safety Authority, EFSA Journal, 14(12):4657-n/a

Web Links:

OIE (2020): Animal Diseases. Available at: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/>.

Accessed 31.12.2020.

Стандарди:

ISO (2017): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. International Organisation for Standardization, ISO 11290-1.

ИСБИХ (2018): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за детекцију и одређивање броја Enterobacteriaceae – Део 2: Метода бројања колонија. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 21528-2.

Захтјеви

Ветеринарски журнал Републике Српске препоручује употребу тачних и утврђених јединица, скраћеница, формула и номенклатуре кад год је то могуће.

Јединице. Све спецификације морају бити наведене у складу са Међународним системом јединица (СИ). Ако су поменуте друге јединице, наведите њихов еквивалент у СИ. Симболи за јединице изведене дељењем дати су као негативни експоненти (нпр. 10 g L⁻¹; 250 V cm⁻²).

Скраћенице. Све скраћенице хемијских, биолошких, медицинских или других израза треба користити само ако је сигурно да су међународно познате. Скраћенице се не користе у кратком садржају и морају се дефинисати у заградама када се први пут користе у главном тексту. Не започињите реченицу скраћеницом.

Математичке формуле. Предајте математичке једначине као текст који се може уређивати, а не као слике. Представите једноставне формуле у складу са нормалним текстом, где је то могуће, и користите солидус (/) умјесто хоризонталне линије за мале разломљене појмове (нпр. А / Б). Узастопно нумеришите све једначине које морају бити приказане одвојено од текста (ако су у тексту изричито наведене).

Номенклатура и таксономија. Сви медицински, хемијски, биолошки или други изрази треба да се користе у складу са најновијим препорукама одговарајуће међународне номенклатуре. Имена родова и врста микроорганизама и зоолошка имена су у курзиву (нпр. *Aeromonas hydrophila*). Тамо где се род појављује у наслову, то треба у потпуности исписати. У главном тексту, род би требало на први начин поменути, а потом и скраћено (нпр. *A. hydrophila*). Аутори морају осигурати да не буде забуне са осталим родовима поменутим у тексту. Правопис и таксономија имена треба да прате међународно прихваћену номенклатуру. Имена бактерија морају бити у складу са најновијим издањем Берџеј-евог Приручника за систематику бактерија и / или мишљењем у Међународном часопису за систематску и еволуциону микробиологију, а вирусима треба дати класификацију и називе које препоручује Међународни комитет за таксономију вируса. Ензимске потенције су дате у И.Ј. (Међународне јединице) и према ензимској номенклатури. Гени, мутације, генотипови и алели су укошени и аутори би требало да консултују одговарајуће базе података генетске номенклатуре. Протеини обично нису у курзиву. Треба навести препоручени међународни заштитени назив лијекова (rINN). Комерцијална имена других производа треба користити само тамо где за производ не постоји други одговарајући термин. У таквим случајевима, име, град и државу произвођача треба навести у заградама при првом помињању производа.

Табеле и слике

Табеле и слике (укључујући графиконе), треба да буду интегрисане у главни текст.

Табеле и слике нумеришу се узастопно помоћу арапских бројева (Слика 1, Слика 2, Табела 1, Табела 2 итд.) и означавају насловом. Наслови табела постављају се изнад табеле, а наслови слика постављају се испод слике. За идентификацију дијелова вишедјелне фигуре треба користити велика слова А, Б итд. Сlike морају бити у резолуцији 300 dpi. Дозвољени формати

- JPG, TIFF. За микрофотографије се морају обезбедити скале са одговарајућим јединицама. Символи, стрелице или слова коришћени на фотографијама треба да буду у контрасту са позадином.

Резултати који се у тексту могу описати као кратки наводи не приказују се као слике или табеле. Подаци се не смију копирати у табеле и слике.

Наслови табела и слика помажу да табеле и слике буду разумљиви, а да читалац не мора да се позива на главни текст. Они морају бити сажети и не користе се за поновни опис методологије. Одговарајући бројеви табела и слика стављају се поред релевантног текста у чланку.

За објашњавање скраћеница табеле могу да садрже фусноте, а слике могу да садрже легенде, које се налазе испод табеле и слике. Потребно је користити натписне арапске бројеве (1, 2 итд., у правилном редослиједу читања табеле, одозго лијево доле десно) да би свака фуснота била повезана с одговарајућом ставком у табели. Легенде слика укључују објашњења свих кориштених симбола, линија или ознака, који се постављају на одговарајуће мјесто у оквиру главног текста.

Ауторско право

Аутори задржавају ауторска права на објављене радове и дају издавачу право да објави чланак, да се у случају поновне употребе наведе као његов изворни издавач и да га дистрибуише у свим облицима и медијима. Ако часопис не прихвати за објављивање предати рукопис, сва права на рукопис задржаће аутор (и).

Чланци објављени у *Ветеринарском журналу Републике Српске* биће чланци са отвореним приступом дистрибуисани под Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.

Изјава о приватности

Имена и адресе е-поште користиће се искључиво у наведене сврхе овог часописа и неће бити доступне у било које друге сврхе или било којој другој страни.

Ажурирано упутство за ауторе: 07. фебруара 2023.

АДРЕСА ЧАСОПИСА:

Јавна Установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“

Бања Лука Бранка Радичевића 18, 78000 Бања Лука

Телефон/факс: +387 51 229-210

Главни уредник: Проф.др Драго Н. Недић: drago.nedic@virs-vb.com;

drago.nedic@gmail.com

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/arhiva/>

<http://doisrpska.nub.rs/index.php/VJRS/issue/archive>

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND REVIEWERS

Submission

By submitting the manuscript, the authors guarantee that their article submitted to the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is their original research, that it was not published earlier, that it is not considered for publication elsewhere, and that its publication was approved by all co-authors, if any, as well as responsible authorities, tacitly or explicitly, in the institution where the study was obtained.

Authors are entirely responsible for the content of their submissions, the accuracy of the experimental results and must ensure that they have the permission of all parties involved to make the data public. Authors wishing to include data or textual parts already published elsewhere must obtain permission from the copyright holders and include evidence that such permission was given when submitting their manuscript. It will be assumed that any material received without such evidence originates from the author.

By submitting the manuscript to the *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, the authors agree with the terms and conditions of the journal. All correspondence, including notification of the editor's decision and review requests, is by e-mail. The text of the manuscript is written in one of the languages in official use in Bosnia and Herzegovina and in good English (American or British English is accepted, but not a mixture of these). The Editor reserves the right to change the submitted manuscripts in accordance with the standards of formal language which is in official use in Bosnia and Herzegovina, or in accordance with English language. Manuscripts are pre-evaluated by the editorial board to verify that they meet basic publishing requirements and quality standards. They are also checked for plagiarism. Authors will be notified by email of receipt of the submission. Only those manuscripts that are in accordance with the Instructions for authors can be accepted for review. Otherwise, the manuscripts will be returned to the authors with observations and comments.

Review procedure

The *Veterinary Journal of Republic of Srpska* offers a fast *online* and printed publication for all articles that have not been published elsewhere, and the review is conducted electronically. The author may be asked to provide contact information of three potential reviewers, but the final decision on the selection of the reviewer is made by the editorial board, without any obligation to contact any of the reviewers recommended by the author. The editor appoints at least two reviewers on the recommendation of editorial board members. Submitted manuscripts are sent to reviewers along with Review instructions and accompanied Manuscript evaluation forms. Acceptance of the manuscript is based on the review and on the final decisions of the reviewers regarding the acceptance decision. The reviewer's decision is one of the following: "Acceptable for publication", "Acceptable after corrections" or "Unacceptable for publication". If there is a nonconformity in the decisions between the reviewers, the Editor may send the manuscript to another reviewer for further comment and further decision or the article will be rejected. Reviewers' identity are unknown to the authors and vice versa

(the double blind review system). The review process is generally expected to begin within two weeks of submitting the manuscript and that the revised manuscripts will be returned within four weeks. The article is published on the website of the *Veterinary Journal of the Republika of Srpska*, on the website of the Agency DOI Srpska and as a printed copy of the publication.

CATEGORIES AND CONDITIONS FOR MANUSCRIPTS

Read the instructions carefully. A manuscript not prepared in accordance with the Instructions for authors, will not be accepted for consideration. Manuscript must be typed using the Times New Roman 12-point font with both left and right margins fully justified, single-spaced lines on A4 size pages, with 3.0 cm margins (such as MS Word files, .doc). Headings of the text should be typed in capital letters and short subtitles, where necessary, only with the initial capital letter.

The Veterinary Journal of Republic of Srpska publishes articles in the field of veterinary medicine and related fields, that are of wide interest to the target audience.

The categories of manuscripts published by the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* are:

- Original research article
- Review article
- Short communication or Working paper
- Case report.

Original research article

Original research article is a article in which the text is published for the first time on the results of own research achieved by applying scientific methods, which are textually described and replicable if necessary, and the established facts are verified. The original research article should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, References. The writing style should be concise but clear enough to allow readers to reproduce the experimental methodology as described. The article must present a clear hypothesis and data expressed according to the appropriate experimental design. The discussion takes into account known data or facts only in relation to the obtained results and provides a basis for drawing conclusions based on the results. The discussion does not include general knowledge of the research topic. An original research article usually contains no more then 4000 words and 30 references.

Review article

A review article summarizes the latest studies in a particular research area in order to summarize, analyze, evaluate or synthesize already published information, and bring new syntheses that also necessarily include the results of the author's own research. Review articles are usually by invitation. Authors who recognize the need and want to submit an article are welcome and are advised to contact the editorial board before writing to make sure that a similar topic has not already been submitted and given to an

author. Authors should be experts in the subject of a review article, as evidenced by citing their published scientific papers in the submitted article (at least five scientific papers, which deal with the same topic as the submitted article). The review article should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Conclusion, References. A review article usually contains no more than 4000 words and 30 references.

Short communication or Working paper

A Short communication or Working paper is a concise research article or a preliminary work, which is a summary of the results of the completed original research work or an work in progress. The Short communication or Working paper should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, References. A Short communication usually contains no more than 3000 words and 15 references.

Case report

A case report is an contribution in which the author assesses the regularity/irregularity of a scientific or professional work, criteria, settings or starting point, with special emphasis on the quality of the evaluated work. The Case report should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Discussion, References. The Case report usually contains no more than 2500 words and 15 references.

MANUSCRIPT LAYOUT, STYLE AND FORMATING

The manuscripts are divided into the following edited sections:

- Title page
 - Summary
 - Keywords
 - INTRODUCTION
 - MATERIALS AND METHODS
 - THE RESULTS*
 - DISCUSSION*
 - CONCLUSION
 - Acknowledgment **
 - Conflict of interest
 - REFERENCES
 - Table titles and/or Figures legends
 - Tables and/or Figures
- * Results and discussion can be in one chapter
** Optional
-

Title page

The title page includes the title of the manuscript, as well as the full names and institutional affiliations of all authors. Corresponding author must be listed.

Title: The title contains no more than 110 characters (including spaces) and is specific to the study. It should be understandable to a wide range of readers.

Authors and affiliations. This includes names, middle initials (if used), surnames and affiliations in the following order: University or Organization/Institution, City and Country for all authors. Superscripts (1,2,3) are used in cases when the authors are from different institutions.

Corresponding author. One of the authors must be marked as a corresponding author (add the symbol * next to the author's name). The name, surname and email of the corresponding author must be stated.

Summary

The summary contains up to 250 words. Sections of the summary should not be separated by titles but only by a new paragraph.

A structured summary is required for an *Original research article* and a *Short communication or Working paper* and is subdivided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results and Conclusion. The methods used must be mentioned without going into methodological details, and the most important findings must be summarized.

The summary for the *Review article* is structured and subdivided into the following sections: Background, Scope and approach, Key findings and Conclusions.

The *Case report* does not require a structured summary, but it does include a summary of the case.

Citations, tables, special abbreviations and significance levels (eg $P < 0.05$) are not included in the summary.

Keywords

Below the Summary, three to five keywords must be listed in alphabetical order, avoiding general, plural and multiple terms (eg "and", "from"). These keywords will be used for indexing.

INTRODUCTION

In this part, the essence of the problem and the purpose of the study should be pointed out. Key aspects of published literature and research should be reviewed to indicate why this manuscript is considered an original contribution to current scientific knowledge. A detailed description of the literature or a summary of the results should be avoided. The last part of the introduction must contain the specific objectives of the study. The introduction contains no more than 400 words.

MATERIALS AND METHODS

This section includes, as appropriate, a description of study design, experimental animals, analytical methods and statistical analyzes. Establish methods and procedures in sufficient detail to enable others to reproduce the study. If the methods are widely known, they are not described, but appropriate references must be given. For novel methods, method protocols should be included. Authors must provide references to established methods, including statistical methods. List any general computer program used. Identify all medications and chemicals used with generic or chemical names, dosages, and routes of administration. Indicate the manufacturer, product number, city and country, where applicable. Provide an Ethical statement on animal welfare if applicable.

THE RESULTS

The results are presented in a logical order and in accordance with the methods (there should be a result for each method), using tables and/or figures without duplicating the results between the two formats. To improve clarity, this section can be divided into subsections, each with a concise subtitle which provides details of the findings needed to support the conclusions of the manuscript.

DISCUSSION

The results should be discussed and linked to other relevant studies and current knowledge where needed. However, discussion is not used to summarize current knowledge. The discussion should clearly identify the main conclusions of the study. The authors should provide a clear explanation of the importance and relevance of these conclusions. All new information should be distinguished from previous findings and relevant hypotheses can be created.

CONCLUSION

The conclusion consists of a brief integration of the results directly related to the stated objectives of the study and a statement of the practical implications of the results. The conclusions are related to the goal of the study, avoiding unqualified statements and conclusions that are not supported by your data. This section should not exceed one short paragraph. Do not summarize the discussion or current knowledge in this section.

Acknowledgements

The source of funding for the study can be listed in this section. This section may list all those persons who have made significant contributions to the study in terms of design, conducting, analysis or providing/revision of manuscripts, but do not meet the authorship criteria.

Conflict of interest

Conflicts of interest exist when the interpretation of data or the presentation of information may be affected by personal or financial relationships with people or organizations. Authors are required to complete a conflict of interest statement. All

reported conflicts of interest will be listed at the end of the published articles. Where the author does not state a conflict of interest, it will state "The author (s) declare that there is no conflict of interest".

REFERENCES

It is necessary to ensure that each reference mentioned in the text is present in the reference list (and vice versa).

It is recommended that references are not older than 20 years and that over 80% of references are from scientific journals, and the rest from other scientific sources.

Citations in the text, such as personal communications, unpublished data or in the press, master's theses, data from anonymous sources, as well as doctoral dissertations that were not prepared as scientific monographs, are not acceptable. Articles from scientific conferences can be cited only if they are published in full. Only essential references should be included in the text, and they are limited to the minimum necessary. Include references in the text as author's surname and year in brackets (eg Kovačević, 2014). In the case of two authors, use "and" (eg Stevanović and Nedić, 2015). The abbreviation "et al." must be used in all cases where more than two authors are cited (e.g. Marasas et al., 2016). Several references within parentheses in the text are listed in reverse chronological order (e.g. Stevanović et al., 2016; Golić and Nedić, 2015; Teodorović, 2014). In case the same author has several publications in the same year, additional letter marks are added in addition to the year (Đoković et al., 2008a; Petrović et al., 2008b).

In the case of references to organizations or standards, abbreviations are used (eg EFSA, 2016; ISO, 2017) and in the case of laws and regulations, the term regulation (eg Regulation, 2012).

The list of references is arranged alphabetically (using the A-Z sorting tool on the MS Word Home bar, if necessary) according to the surnames of the first authors.

Examples:

Journals:

Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.

Books, Monographs and Manuals:

Stockham L.S., Scott A. M. (2008): Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Blackwell Publishing, 415.

Тешић М., Недић Д. (2011): Менаџмент ветеринарске праксе. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, 286.

FDA (2006): Managing Food Safety: A Manual for the Voluntary Use of HACCP Principles for Operators of Food Service and Retail Establishments. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Books with author's chapters:

Marasas W. F. O. (1996): Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology. Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries, L. B. Bullerman, Plenum Press, 118.

Laws and regulations:

Regulation (2013): Commission Regulation (EU) No 1019/2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. Official Journal of the European Union, L 282:46-47.

Regulation (2012): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну. Службени гласник Републике Српске, 109/12.

Scientific conferences:

Vasilev D., Aleksic B., Tarbuk A., Dimitrijevic M., Karabasil N., Cobanovic N., Vasiljevic N. (2015): Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages sremiski and lemeski kulen. In the 58th International Meat Industry Conference (MeatCon2015), Procedia Food Science, 5:300-303.

Citations with organisations as authors:

EFSA (2016): Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzoic acid.

European Food Safety Authority, EFSA Journal, 14(12):4657-n/a

Web Links:

OIE (2020): Animal Diseases. Available at: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/>. Accessed 31.12.2020.

Standards:

ISO (2017): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. International Organisation for Standardization, ISO 11290-1.

ISBIH (2018): Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count technique. Institute for standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 21528-2.

Requirements:

The Veterinary Journal of Republic of Srpska recommends the use of accurate and established units, abbreviations, formulas and nomenclatures whenever possible.

Units. All specifications must be listed in accordance with the International System of Units (SI). If other units are mentioned, indicate their equivalent in SI. Symbols for divisible units are given as negative exponents (eg 10 g L⁻¹; 250 V cm⁻²).

Abbreviations. All abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should be used only if it is certain that they are internationally known. Abbreviations are not used in the summary and must be defined in parentheses when first used in the main text. Do not start a sentence with an abbreviation.

Math formulas. Submit mathematical equations as editable text, not as images. Present simple formulas in accordance with normal text, where possible, and use forward slash (/) instead of a horizontal line to separate terms (e.g. A / B). Sequentially number all

equations that must be shown separately from the text (if they are explicitly stated in the text).

Nomenclature and taxonomy. All medical, chemical, biological or other terms should be used in accordance with the latest recommendations of the relevant international nomenclature. Names of genera and species of microorganisms and zoological names are in italics (e.g. *Aeromonas hydrophila*). Where the genus appears in the title, it should be written in full. In the main text, the genus should be mentioned first, and then abbreviated (eg *A. hydrophila*). Authors must ensure that there is no confusion with other genera mentioned in the text. Spelling and taxonomy of names should follow internationally accepted nomenclature. Bacterial names must be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and/or opinion in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, and viruses should be given the classification and names recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Enzymatic potencies are given in I.U. (International Units) and by enzyme nomenclature. Genes, mutations, genotypes and alleles are in italics and the authors should consult the appropriate databases of genetic nomenclature. Proteins are not usually in italics. The recommended International Nonproprietary Name (rINN) should be provided. Commercial names of other products should be used only where there is no other appropriate term for the product. In such cases, the name, city and country of the manufacturer should be given in brackets when the product is first mentioned.

Tables and figures

Tables and figures (including graphs) should be integrated into the main text.

Tables and figures are numbered consecutively using Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, Table 1, Table 2 etc.) and labeled with a title. Table titles are placed above the table and figure titles are placed below the figure. Capital letters A, B etc. should be used to identify parts of a multi-part figure. Images must be at a resolution of 300 dpi. Allowed formats are JPG, TIFF. Scales with appropriate units must be provided for microphotographs. Symbols, arrows or letters used in photographs should contrast with the background.

Results that can be described in the text as short statements are not shown as figures or tables. Data must not be copied into tables and figures.

Table and figure headings help make the tables and figures understandable without the reader having to refer to the main text. They must be concise and are not used to re-describe the methodology. Corresponding numbers of tables and figures are placed next to the relevant text in the article.

To explain abbreviations, tables may contain footnotes, and figures may contain legends, which are located below the table and figures. It is necessary to use superscript Arabic numerals (1, 2 etc., in the correct order of reading the table, from top left to bottom right) to link each footnote to the corresponding item in the table. Figure legends include explanations of all used symbols, lines or marks, which are placed in the appropriate place within the main text.

Copyright

Authors retain the copyright to published articles and give the publisher the right to publish the article, to be listed as its original publisher in case of re-use and to distribute it in all forms and media. If the journal does not accept the submitted manuscript for publication, all rights to the manuscript will be retained by the author (s).

Articles published in the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* will be open access articles distributed under the Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.

Privacy Statement

The names and e-mail addresses will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be available for any other purpose or to any other party.

Updated instructions for authors: February 7, 2023.

JOURNAL ADDRESS:

Public Institution Veterinary Institute of Republic of Srpska “Dr Vaso Butozan” Banja Luka
Branka Radičevića 18, 78000 Banja Luka

Phone/fax: +387 51 229-210

Editor-in-Chief: Prof. Dr. Drago N. Nedić: drago.nedic@virs-vb.com;
drago.nedic@gmail.com

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/arhiva/>

<http://doisrpska.nub.rs/index.php/VJRS/issue/archive>

