

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 Штампа-Print

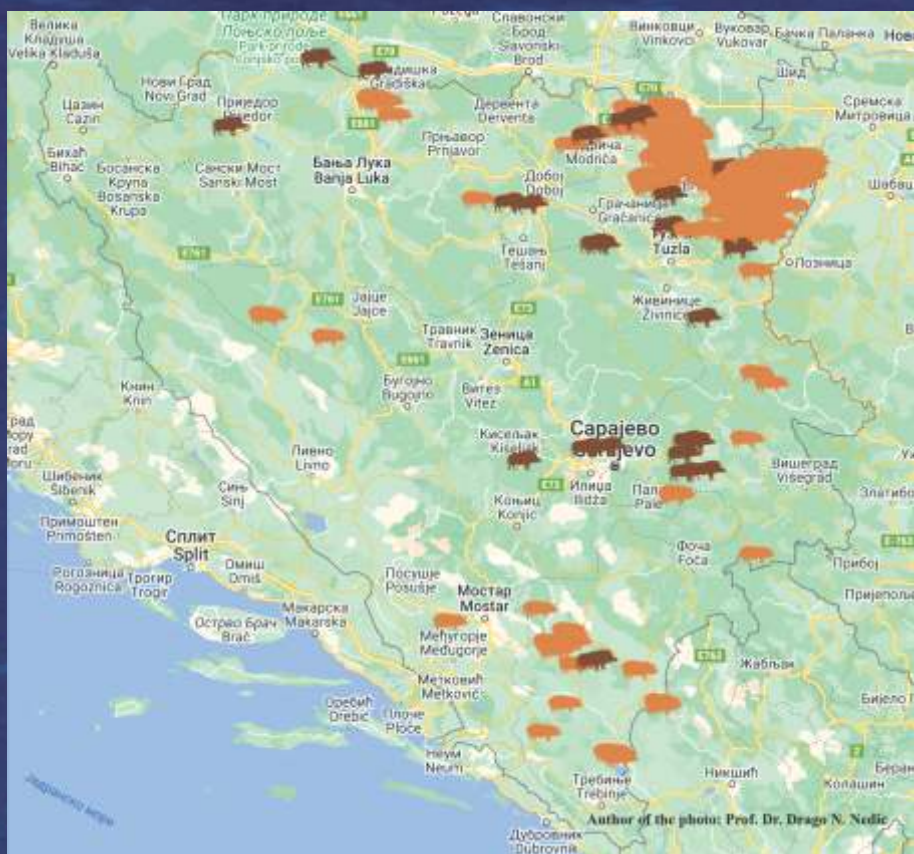
ISSN 2303-4475 Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ



Veterinary Journal of Republic of Srpska

Волумен/Volumen XXIII, бр./No 1-2, стр./page 01-363, Бања Лука/Banja Luka, 2023



Афричка куга свиња у Босни и Херцеговини у 2023.
African swine fever in Bosnia and Herzegovina in 2023

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. 23, број 1-2, стр. 1-363, Бања Лука, 2023
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XXIII, No 1-2, page 1-363, Banja Luka, 2023

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. Nedic (БиХ-РС, В&Н-RS)

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР – INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD:

Др Милорад Мириловић, Dr Milorad Mirilović, PhD, (Србија-Serbia)
Др Жељко Цветић, 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 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, В&Н)
Др Биљана Пећанац, Dr Biljana Pećanac, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)
Др Родолуб 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 Виолета Сантрач, Dr Violeta Santrač, 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 - ЛЕКТОР: 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

78000 Бања Лука, Бранка Радичевића 18; 78000 Banja Luka, Branka Radičevića 18,

Тел: 051/229-210, Е-mail: drago.nedic@virs-vb.com,

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/> <http://doisrpska.nub.rs/index.php/VIRS>

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	Стр./pp
ВОДА У ИНДУСТРИЈИ ХРАНЕ – МИКРОБИОЛОШКИ ОСВРТ <i>Бојан Голић, Драго Н. Недић, Биљана Пећанац</i>	5-13
WATER IN FOOD INDUSTRY – MICROBIOLOGICAL REVIEW <i>Bojan Golić, Drago N. Nedić, Biljana Pećanac</i>	14-22
ЗНАЧАЈ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И Ц-РЕАКТИВНОГ ПРОТЕИНА КАО МОГУЋИХ БИОМАРКЕРА У ДИЈАГНОСТИЦИ МИКСОБОЛИЈАЗЕ ИЗАЗВАНЕ СА <i>Myxobolus cerebralis</i> КОД КАЛИФОРНИЈСКЕ ПАСТРМКЕ (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) <i>Dimitrinka Zapryanova, Cigdem Urku, Galin Nikolov, Alexander Atanasoff</i>	23-31
THE SIGNIFICANCE OF CERULOPLASMIN AND C-REACTIVE PROTEIN AS POSSIBLE MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF MYXOBOLOUS INFECTION CAUSED BY <i>Myxobolus cerebralis</i> IN RAINBOW TROUT (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) <i>Dimitrinka Zapryanova, Cigdem Urku, Galin Nikolov, Alexander Atanasoff</i>	32-40
ИСТРАЖИВАЊЕ О МИШЉЕЊУ СТУДЕНАТА ПРВЕ И ЗАВРШНЕ ГОДИНЕ ФАКУЛТЕТА ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ О ПРАВИМА И ДОБРОБИТИ ЖИВОТИЊА <i>Дајана Давитков, Бранислав Вејновић, Вишња Јовановић, Дарко Давитков, Софија Шолаја, Јелена Алексић Радојковић</i>	41-49
OPINION OF FIRST AND FINAL YEAR VETERINARY STUDENTS ON THE RIGHTS AND WELFARE OF ANIMALS <i>Dajana DAVITKOV, Branislav VEJNOVIĆ, Višnja JOVANOVIĆ, Darko DAVITKOV, Sofija ŠOLAJA, Jelena Aleksić RADOJKOVIĆ*</i>	50-58
ОСЈЕТЛИВОСТ БАКТЕРИЈСКИХ СОЈЕВА ИЗОЛОВАНИХ У СЛУЧАЈЕВИМА МАСТИТИСА КРАВА НА АНТИБИОТИКЕ И ЕТЕРИЧНА УЛЈА <i>Сајма Хуремовић</i>	59-81
SENSITIVITY OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED IN CASES OF COW MASTITIS TO ANTIBIOTICS AND ESSENTIAL OILS <i>Sajma Huremović</i>	82-105
ВЕРИФИКАЦИЈА И ПРОЦЈЕНА МЈЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА УТВРЂИВАЊЕ КОЛИЧИНЕ ХИСТАМИНА У РИБИ И ПРОИЗВОДИМА ОД РИБЕ <i>Јелена Аничич, Миљана Голић, Биљана Пећанац</i>	106-117

VERIFICATION AND ASSESSMENT OF THE MEASUREMENT UNCERTAINTY OF THE HPLC METHOD FOR DETERMINING THE AMOUNT OF HISTAMINE IN FISH AND FISHERY PRODUCTS <i>Jelena Aničić, Milijana Golić, Biljana Pećanac</i>	118-129
---	---------

МИКРОБИОЛОШКА ЧИСТОЋА У ЛАНЦУ ХРАНЕ <i>Бојан Голић, Драго Н. Недић, Драган Касагић, Амела Јамаковић</i>	130-142
--	---------

MICROBIAL PURITY IN FOOD CHAIN <i>Bojan Golić, Drago N. Nedić, Dragan Kasagić, Amela Jamaković</i>	143-155
---	---------

ВЕКТОРСКЕ ЗООНОЗЕ КОЈЕ МОГУ ДА УГРОЗЕ РЕГИОН ЈУГОИСТОЧНЕ ЕВРОПЕ <i>Мирослав Валчић, Ана Васић, Драго Недић</i>	156-182
---	---------

VECTOR ZOONOSSES THAT MAY THREATEN THE REGION OF SOUTHEAST EUROPE <i>Miroslav Valčić, Ana Vasić, Drago Nedić</i>	183-208
---	---------

САВРЕМЕНЕ СТРАТЕГИЈЕ КОНТРОЛЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНИХ НЕМАТОДА КОД ОВАЦА <i>Филип Штрбац, Слободан Крњајић, Драгица Стојановић, Радомир Ратајац</i>	209-226
--	---------

NOVEL STRATEGIES FOR THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN SHEEP <i>Filip Štrbac, Slobodan Krnjajić, Dragica Stojanović, Radomir Ratajac</i>	227-245
--	---------

ЕФЕКАТ ЕТАРСКИХ УЉА НА ПАТОГЕНЕ БАКТЕРИЈЕ ПОРЕКЛОМ ИЗ МЕСА <i>Сузана Видаковић Кнежевић, Јелена Вранешевић, Слободан Кнежевић, Зоран Руџић, Дубравка Миланов, Сунчица Коцић-Танацков, Неђељко Карабасил</i>	246-257
--	---------

THE EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON PATHOGENIC BACTERIA IN MEAT <i>Suzana Vidaković Knežević, Jelena Vranešević, Slobodan Knežević, Zoran Ružić, Dubravka Milanov, Sunčica Kocić-Tanackov, Neđeljko Karabasil</i>	258-269
--	---------

ФОСФАТИ И НИТРИТИ – НАЈЧЕШЋЕ КОРИШЋЕНИ АДИТИВИ У ИНДУСТРИЈИ МЕСА <i>Биљана Пећанац, Драго Н. Недић, Бојан Голић</i>	270-282
--	---------

PHOSPHATE AND NITRITE - THE MOST COMMONLY USED ADDITIVES IN THE MEAT INDUSTRY <i>Biljana Pećanac, Drago N. Nedić, Bojan Golić</i>	283-294
--	---------

PATOGENEZA LAMINITISA MLEČNIH KRAVA 295-306

Jovan Bojkovski, Sreten Nedić, Sveta Arsić, Ivan Vujanac, Radiša Prodanović, Aleksandra Mitrović, Miloje Đurić, Dejan Bugarski, Nikolaos K. Panousis, Emmanouil Kalaitzakis, Milan Ninković

PATHOGENESIS OF LAMINITIS IN DAIRY COWS 307-317

Jovan Bojkovski, Sreten Nedić, Sveta Arsić, Ivan Vujanac, Radiša Prodanović, Aleksandra Mitrović, Miloje Đurić, Dejan Bugarski, Nikolaos K. Panousis, Emmanouil Kalaitzakis, Milan Ninković

PROMJENA FREKVENCE PULSA KONJA KAO INDIKATOR STRESA UZROKOVANOG UTOVAROM U PREVOZNO SREDSTVO 318-332

Predrag Ilić, Stoja Jotanović, Slaven Grbić, Jasmin Kazazović

CHANGE OF PULSE FREQUENCY IN HORSES 333-347

AS AN INDICATOR OF STRESS CAUSED BY
LOADING INTO THE TRAILER

Predrag Ilić, Stoja Jotanović, Slaven Grbić, Jasmin Kazazović

УПУТСТВО АУТОРИМА И РЕЦЕНЗЕНТИМА INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND REVIEWERS 348-363

DOI 10.7251/VETJSR2301005G

UDK 663/664:613.26/29]:628.1.03

Оригинални научни рад

ВОДА У ИНДУСТРИЈИ ХРАНЕ – МИКРОБИОЛОШКИ ОСВРТ

Бојан ГОЛИЋ^{1*}, Драго Н. НЕДИЋ², Биљана ПЕЋАНАЦ¹

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

²Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

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

Сажетак

Вода се користи на различите начине у производњи хране, чиме постаје дио хране. Вода за прање у прехранбеној индустрији може бити извор бактеријске контаминације и додатно угрозити квалитет и безбједност хране. Истраживањем су обухваћени узорци воде која се користи у прехранбеној индустрији. Испитивање обухвата 192 узорка, од којих је 75% из водовода, а 25% из бунара. 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 у прехранбеној индустрији. Истраживањем је утврђено 79,69% задовољавајућих узорака и 20,31% незадовољавајућих узорака воде. У односу на испитиване параметре, у 12,50% узорака утврђен је повећан број микроорганизама на 22°C, а у 10,42% узорака утврђен је повећан број микроорганизама на 37°C. Када су у питању индикатори хигијене, 8,85% незадовољавајућих узорака је било због присуства пријевних ентерокока, а 5,73% незадовољавајућих узорака због присуства *Escherichia coli* и колиформа. С обзиром на присуство колиформних бактерија, *Escherichia coli* и пријевних ентерокока у води која се користи у прехранбеној индустрији, постоји ризик од микробиолошке контаминације хране путем воде. Ово је посебно значајно с обзиром на удио бунарске воде у односу на укупну воду која се користи у индустрији хране.

Кључне ријечи: индустрија хране, вода, микробиологија.

УВОД

Вода се користи на различите начине у производњи хране, чиме постаје дио хране (Terplan, 1980). Контаминација хране микроорганизмима који се преносе водом дешава се директно, међутим, много чешће индиректно након умножавања ових микроорганизама на очишћеним површинама опреме која се користи.

Микробиолошки квалитет воде се обично дефинише као максимално прихватљив број или концентрација бактерија које не представљају опасност по здравље (EU, 2020). Ниво нулте вјероватноће микробиолошке контаминације воде за пиће не постоји.

Системи за дистрибуцију и испоруку воде за пиће не могу бити потпуно стерилни, а активни раст микроорганизама се сматра показатељем кварова у јединицама за прераду воде или дистрибуцији (Gottschal, 1992).

Вода за прање у прехранбеној индустрији може бити извор бактеријске контаминације и додатно угрозити квалитет и безбједност хране (Kivaria и сар., 2006; Perkins и сар., 2009). Такође, вода која се користи током руковања и прераде хране може бити потенцијални извор микробне контаминације с могућим негативним посљедицама по безбједност хране.

Производња и дистрибуција биолошки стабилне воде за пиће може се постићи само адекватним праћењем и контролом микробиолошког статуса током третмана и дистрибуције воде (Prest и сар., 2016).

Снабдјевање водом у просторијама за производњу хране треба да буде предмет процјене ризика и опасности како би се обезбиједило одржавање одговарајућег квалитета воде током процеса производње (Dawson, 1998; Dawson, 2000).

Многе заразне болести животиња и људи преносе се водом контаминираним људским и животињским излучевинама, која постаје извор патогених бактерија, вируса и паразита (протозоа, јаја паразита) способних да преживе у различитим периодима и повећавају ризик по здравље многих људи (Fridrich и сар., 2014; Sasakova и сар., 2013).

Температура воде је суштински фактор који утиче на кинетику раста бактерија и процесе компетиције. Температуре воде за пиће се обично крећу између 3 и 25°C у европским земљама и сезонски варирају унутар овог температурног распона чак и унутар једног система дистрибуције воде за пиће (Niquette и сар., 2001). Повишене температуре воде се често повезују с повећаном заступљеношћу бактерија у системима за дистрибуцију воде за пиће, и са већим бројем индикаторских организама као што су колиформе (Francisque и сар., 2009; Liu и сар., 2013).

Да би се елиминисао ризик од преношења болести, вода намијењена масовној потрошњи се прије употребе третира и дезинфикује (Edberg и сар., 2000). На основу резултата могу се предузети адекватне мјере које укључују превенцију контаминације и системску дезинфекцију. Многи патогени микроорганизми су присутни само под одређеним условима и, када су присутни, јављају се у малом броју у поређењу с другим микроорганизмима.

Индикаторски организми се користе за процјену микробиолошког квалитета воде. Употреба индикаторских бактерија, посебно *Escherichia coli* и колиформних бактерија, као средства за процјену потенцијалног присуства патогена који се преносе водом, је кључна за заштиту јавног здравља (Нјпеп и сар., 2000). *Escherichia coli* је колиформна бактерија и сматра се примарним индикатором фекалне контаминације воде. Ентерококе обухватају бројне врсте које се јављају у фецесу људи и топлокрвних животиња (ВНО, 2008). Главни разлог за њихово утврђивање је процјена значаја присуства колиформних бактерија у одсуству *Escherichia coli* или давање додатних информација приликом процјене степена могуће фекалне контаминације. Као такви, они се сматрају секундарним индикаторима фекалног загађења.

Бактерија има у води за пиће, чак и у релативно великом броју (10^3 до 10^6 CFU/ml), без посљедица по људско здравље. Присуство бактерија у води за пиће само по себи није проблем, све док нема присутних патогених микроорганизама (Hoefel и сар., 2005; Hammes и сар., 2008; Vital и сар., 2012).

Циљ истраживања је утврђивање микробиолошког статуса воде која се користи у прехранбеној индустрији на територији Републике Српске.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Истраживањем су обухваћени узорци воде која се користи у прехранбеној индустрији. Узорци су узети из објеката за прераду меса, млијека и рибе и из угоститељских објеката (храна готова) са територије Републике Српске (Босна и Херцеговина). 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.

Истраживање је обављено током 2022. године и обухватило је 192 узорка, од којих је 75% из водовода, а 25% из бунара.

Лабораторијско испитивање воде врши се следећим 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

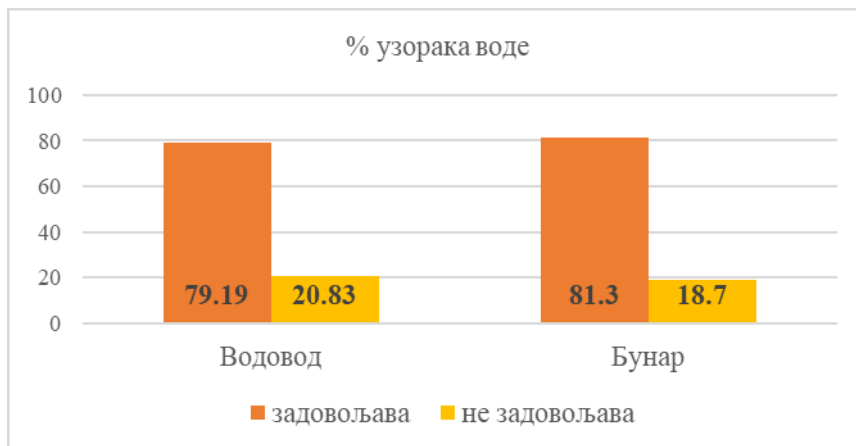
Параметар	Критеријум
Број микроорганизама на 22°C	100CFU/1 ml
Број микроорганизама на 37°C	20CFU/1 ml
Цријевне ентерококе	0CFU/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	0CFU/100 ml
Колиформи	0CFU/100 ml

У нашем истраживању и у статистичкој анализи добијених резултата користили смо, као основне статистичке методе, дескриптивне статистичке параметре (Excel, Microsoft Office 2019). Резултати истраживања приказани су табеларно и графички.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

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

Испитивањем је утврђено 79,69% задовољавајућих и 20,31% незадовољавајућих узорака, а резултати испитивања по категоријама приказани су на Слици 1.



Слика 1 Резултати испитивања по категоријама у %

Kalaba и сар. (2020) су у периоду 2015-2017 године, од 584 узорка воде, утврдили 26,20% незадовољавајућих узорка. Анализом воде са сабирних мјеста млијека, поријеклом из бунара, утврђено је 63,90% незадовољавајућих узорка (Јаки и сар., 2010). У студији Golić и сар. (2021) утврђено је 88,16% задовољавајућих и 11,84% незадовољавајућих узорка.

Посматрајући укупан број анализираних узорка, добијени резултати су значајно неповољнији у односу на резултате Golić и сар. (2021), као и за воду поријеклом из водовода, док је ситуација обрнута када су у питању узорци бунарске воде. Добијени резултати су у складу с резултатима Kalaba и сар. (2020). Добијени резултати су неочекивани односно указују на потенцијалну нелогичност, јер је за очекивати да ће бити више задовољавајућих резултата за воду из водовода у односу на бунарску воду, с обзиром да је водовод под редовним свакодневним надзором, а бунари периодично. Могуће објашњење за овакве резултате је то да када је у питању водовод, односно систем јавног снабдијевања водом, дистрибутер је одговоран за микробиолошку исправност воде до мјеста дистрибуције, а од њега до мјеста кориштења одговоран је корисник воде, што може да указује на могућ лош квалитет или неисправност инсталација од мјеста дистрибуције до мјеста кориштења и посљедичну контаминацију воде.

Табела 2 приказује незадовољавајуће резултате испитивања укупног броја узорка у односу на параметре испитивања, а Табела 3 приказује незадовољавајуће резултате испитивања узорка по категоријама у односу на параметре испитивања.

Табела 2 Незадовољавајући узорци према параметрима испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %
Број микроорганизама на 22°C	12,50
Број микроорганизама на 37°C	10,42
Цријевне ентерококе	8,85
<i>Escherichia coli</i>	5,73
Колиформи	5,73

Табела 3 Незадовољавајући узорци по категоријама према параметрима испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %	
	Водовод	Бунар
Број микроорганизама на 22°C	11,81	6,25
Број микроорганизама на 37°C	11,81	6,25
Цријевне ентерококе	6,94	14,58
<i>Escherichia coli</i>	5,56	6,25
Колиформи	5,56	6,25

Према WHO (2008), *Escherichia coli* је једини прави показатељ фекалне контаминације, искључиво је цријевог поријекла и налази се у фецесу. Њено присуство указује на углавном свјежу фекалну контаминацију и на тај начин указује на озбиљне недостатке у заштити конкретног извора воде, третману воде и њеној хигијенској исправности. Број микроорганизама на 22°C и на 37°C представља општу популацију хетеротрофних бактерија присутних у залихама воде. Оне могу представљати бактерије чије је природно станиште водена средина или оне које потичу из земљишта или вегетације. Број хетеротрофа укључује све микроорганизме који су способни да расту у или на чврстом агару богатом храњивим материјама. Две температуре и два времена инкубације се користе за анализе, на 37°C током 48 часова да би се подстакао раст бактерија сисарског порекла и на 22°C током 72 часа да би се подстакао раст бактерија које потичу углавном из извора животне средине. Резултати испитивања указују да узроци микробиолошког кvara воде потичу

подједнако и од животиња и од животне средине. Када су у питању бунари, контаминација од животиња је врло могућа због неадекватног одводњавања отпадних и фекалних вода и посљедичне контаминације подземних вода. Добијени резултати су у складу са резултатима Kalaba и сар. (2020) и указују на значајну фекалну контаминацију воде, посебно цријевним ентерококама. У односу на резултате Golić и сар. (2021), утврђен је значајно већи проценат незадовољавајућих узорака. Посматрајући добијене резултате уочава се да је веће присуство индикаторских организама у бунарској води, док је број микроорганизама на 22°C и на 37°C већи у води из водовода. Иако присуство колиформних бактерија не указује увијек на пријетњу по јавно здравље, њихово откривање је корисна индикација да треба истражити операције третирања воде (Edberg, 2000).

ЗАКЉУЧАК

С обзиром на присуство колиформних бактерија, *Escherichia coli* и цријевних ентерокока у води која се користи у прехранбеној индустрији, постоји ризик од микробиолошке контаминације хране путем воде. Ово је посебно значајно с обзиром на удио бунарске воде у односу на укупну воду која се користи у индустрији хране. Из овог разлога потребно је уложити све напоре да се постигне што бољи квалитет воде за пиће.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Dawson D. (1998): Water Quality for the Food Industry: An Introductory Manual CCRFA Guideline No. 21. Campden and Chorleywood Food Research Association.
- Dawson D. (2000): Water Quality for the Food Industry: Management and Microbiological Issues CCRFA Guideline No. 27. Campden and Chorleywood Food Research Association.
- 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*, 88:106-16.
- EU (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*, L435:1-62.
-

- Francisque A., Rodriguez M. J., Miranda-Moreno L. F., Sadiq R., Proulx F. (2009): Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water distribution system. *Water Res.*, 43:1075-87.
- 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.
- Golic B., Kalaba V., Ilic T., Sladojevic Z. (2021): Review of microbiological analysis of water in meat, milk and fish production in the Republic of Srpska (Bosnia & Herzegovina) in the period 2018-2020. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 854(2021) 012031:1-5.
- Gottschal J. C. (1992): Substrate capturing and growth in various ecosystems. *J. Applied Bacteriol. Symp. Suppl.*, 73:39-48.
- 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*, 34:1659-65.
- 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.
- ИСБИХ (2003а): 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.
- Jaki V., Majnarić D., Lukačić M. (2010): The analysis of drinking water from the milk collection point in the Križevci area. In the 39th Croatian Symposium of Dairy Experts with International Participation, Book of Abstracts, 56-57.
- Kalaba V., Golic B., Ilić T. (2020): Microbiological safety of water in primary production of food. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 20(1-2):66-80.
-

- Kivaria F. M., Noordhuizen J. P. T. M., Kapaga A. M. (2006): Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. *Trop Anim Health Prod.*, 38(3):185-94.
- Liu G., Verberk J. Q., Van Dijk J. C. (2013): Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9265-76.
- Niquette P., Servais P., Savoir R. (2001): Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Res.*, 35:675-82
- Perkins N. R., Kelton D. F., Hand K. J., MacNaughton G., Berke O., Leslie K. E. (2009): An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. *J Dairy Sci.*, 92:3714-22.
- 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 намијењене за људску потрошњу. Службени гласник Републике Српске, 88/17.
- 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*, 3:262-65.
- Terplan G. (1980): The role of water in the production and processing of milk. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.*, 172(1-3):96-104.
- 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.

Рад примљен: 02.06.2023.
Рад прихваћен: 28.07.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301014G

UDK 663/664:613.26/29]:628.1.03

Original Scientific Paper**WATER IN FOOD INDUSTRY – MICROBIOLOGICAL REVIEW****Bojan GOLIC^{1*}, Drago N. NEDIĆ², Biljana PEĆANAC¹**¹PI Veterinary Institute of the Republic of Srpska “Dr Vaso Butozan” Banja Luka,
Bosnia and Herzegovina²University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

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

Summary

Water is used in different ways in the production of food, thus becoming a part of food. Washing water in the food industry can be a source of bacterial contamination and further endanger the quality and safety of food. The research included samples of water used in the food industry. The study includes 192 samples, of which 75% are from water supply and 25% from wells. Laboratory testing of water was carried out using 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 in the food industry. The study determined 79.69% satisfactory samples and 20.31% unsatisfactory water samples. In relation to the tested parameters, in 12.50% of the samples, an increased number of microorganisms was found at 22°C, while in 10.42% of the samples, an increased number of microorganisms was found at 37°C. When it comes to hygiene indicators, 8.85% of unsatisfactory samples were due to the presence of intestinal enterococci, and 5.73% of unsatisfactory samples were due to the presence of *Escherichia coli* and coliforms. Considering the presence of coliform bacteria, *Escherichia coli* and intestinal enterococci in water used in the food industry, there is a risk of microbiological contamination of food through water. This is particularly significant considering the share of well water in relation to the total water used in the food industry.

Key words: food industry, water, microbiology.

INTRODUCTION

Water is used in different ways in food production, thus becoming part of food (Terplan, 1980). Contamination of food with water-borne microorganisms occurs directly, however, much more often indirectly after the multiplication of these microorganisms on the cleaned surfaces of the equipment used.

The microbiological quality of water is usually defined as the maximum acceptable number or concentration of bacteria that do not pose a health risk (EU, 2020). There is no level of zero probability of microbiological contamination of drinking water. Drinking water distribution and delivery systems cannot be completely sterile, and active growth of microorganisms is considered an indicator of malfunctions in water treatment or distribution units (Gottschal, 1992).

Washing water in the food industry can be a source of bacterial contamination and further endanger the quality and safety of food (Kivaria et al., 2006; Perkins et al., 2009). Also, water used during food handling and processing can be a potential source of microbial contamination with possible negative consequences for food safety.

Production and distribution of biologically safe drinking water can only be achieved by adequate monitoring and control of microbiological status during water treatment and distribution (Prest et al., 2016).

Water supply in food production premises should be subject to risk and hazard assessment to ensure maintenance of adequate water quality during the production process (Dawson, 1998; Dawson, 2000).

Many infectious diseases of animals and humans are transmitted by water contaminated with human and animal excrement, which becomes a source of pathogenic bacteria, viruses and parasites (protozoa, parasite eggs) capable of surviving in different periods and increasing the risk to the health of people (Fridrich et al., 2014; Sasakova et al., 2013).

Water temperature is an essential factor that affects the kinetics of bacterial growth and competition processes. Drinking water temperatures typically range between 3 and 25°C in European countries and vary seasonally within this temperature range even within a single drinking water distribution system (Niquette et al., 2001). Elevated water temperatures are often associated with increased abundance of bacteria in drinking water distribution systems, and with higher numbers of indicator organisms such as coliforms (Francisque et al., 2009; Liu et al., 2013).

To eliminate the risk of disease transmission, water intended for mass consumption is treated and disinfected before use (Edberg et al., 2000). Based on the results, adequate measures can be taken that include prevention of contamination and systemic disinfection. Many pathogenic microorganisms are present only under

certain conditions and, when present, occur in small numbers compared to other microorganisms.

Indicator organisms are used to assess the microbiological quality of water. The use of indicator bacteria, especially *Escherichia coli* and coliform bacteria, as a factor of assessing the potential presence of waterborne pathogens is essential for public health protection (Hijnen et al., 2000). *Escherichia coli* is a coliform bacterium and is considered the primary indicator of fecal contamination of water. Enterococci include numerous species that occur in the feces of humans and warm-blooded animals (WHO, 2008). The main reason for their determination is to assess the significance of the presence of coliform bacteria in the absence of *Escherichia coli* or to provide additional information when assessing the degree of possible fecal contamination. As such, they are considered secondary indicators of fecal pollution. The bacteria is present in drinking water, even in relatively large numbers (10^3 to 10^6 CFU/ml), without consequences for human health. The presence of bacteria in drinking water is not a problem by itself, as long as no pathogenic microorganisms are present (Hoefel et al., 2005; Hammes et al., 2008; Vital et al., 2012).

The aim of the study is to determine the microbiological status of water used in the food industry in the territory of the Republic of Srpska.

MATERIALS AND METHODS

The study included samples of water used in the food industry. The samples were taken from facilities for processing meat, milk and fish and from catering facilities (ready-to-eat food) from the territory of the Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina). Sampling was done in such a way that all attachments 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 flame sterilized, 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, whereby water in the amount of $\frac{3}{4}$ of the volume of the bottle was poured into them. The samples were transported at a temperature of $5\pm 3^\circ\text{C}$, and the test was performed within 6 hours of sampling.

The study was carried out in year 2022 and included 192 samples, 75% of which were from water supply and 25% from wells.

Laboratory testing of water was carried out by the following methods:

- the 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 Water Intended for Human Consumption (Rulebook, 2017) establishes test parameters and microbiological criteria (Table 1).

Table 1 Test parameters and microbiological criteria

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

In our study and in the statistical analysis of the obtained results, we used descriptive statistical parameters (Excel, Microsoft Office 2019) as basic statistical methods. The results of the study are presented in tables and graphics.

RESULTS AND DISCUSSION

The conformity assessment of the samples was carried out in relation to the Rulebook on the Health Safety of Water Intended for Human Consumption (Rulebook, 2017). The test determined 79.69% satisfactory and 20.31% unsatisfactory samples, and the test results by category are shown in Figure 1.

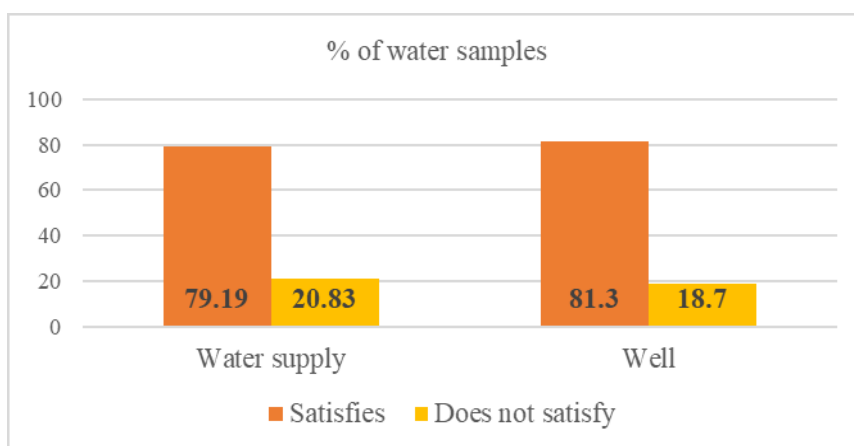


Figure 1 Test results by category in %

During the period from year 2015 until year 2017, Kalaba et al. (2020) found 26.20% unsatisfactory samples, out of 584 water samples. Analysis of water from milk collection points, originating from wells, revealed 63.90% of unsatisfactory samples (Jaki et al., 2010). In the study done by Golić et al. (2021) 88.16% satisfactory and 11.84% unsatisfactory samples were found.

Looking at the total number of analyzed samples, the obtained results are significantly less favorable than the results of Golić et al. (2021) for water originating from the water supply, while the situation is reversed when it comes to well water samples. The obtained results are in accordance with the results of Kalaba et al. (2020). The obtained results are unexpected, that is, they indicate a potential illogicality, because it is to be expected that there will be more satisfactory results for water from the water supply compared to well water, given that the water supply is under regular daily supervision, and the wells periodically. A possible explanation for these results is that when it comes to the water supply system, that is, the public water supply system, the distributor is responsible for the microbiological safety of the water to the point of distribution, and from it to the point of use, the water user is responsible, which may indicate possible poor quality or malfunction of installations from the point of distribution to the point of use and the consequent contamination of water.

Table 2 shows the unsatisfactory test results of the total number of samples in relation to the test parameters, and Table 3 shows the unsatisfactory test results of the samples by category in relation to the test parameters.

Table 2 Unsatisfactory samples in relation to test parameters

Parameter	Unsatisfactory samples in %
Number of microorganisms at 22°C	12.50
Number of microorganisms at 37°C	10.42
Intestinal enterococci	8.85
<i>Escherichia coli</i>	5.73
Coliforms	5.73

Table 3 Unsatisfactory samples by category in relation to test parameters

Parameter	Unsatisfactory samples in %	
	Water supply	Well water
Number of microorganisms at 22°C	11.81	6.25
Number of microorganisms at 37°C	11.81	6.25
Intestinal enterococci	6.94	14.58
<i>Escherichia coli</i>	5.56	6.25
Coliforms	5.56	6.25

According to WHO (2008), *Escherichia coli* is the only true indicator of fecal contamination, as it is exclusively of intestinal origin and is found in feces. Its presence indicates mostly fresh fecal contamination and thus indicates serious deficiencies in the protection of the specific water source, water treatment and its hygienic safety. The number of microorganisms at 22°C and at 37°C represents the general population of heterotrophic bacteria present in water supplies. They can represent bacteria whose natural habitat is the aquatic environment or those originating from soil or vegetation. The number of heterotrophs includes all microorganisms capable of growing in or on solid nutrient-rich agar. Two temperatures and two incubation times are used for the analyses, at 37°C for 48 hours to encourage the growth of bacteria of mammalian origin and at 22°C for 72 hours to encourage the growth of bacteria originating mainly from environmental sources. The test results indicate that the causes of microbiological deterioration of water come from both animals and the environment. When it comes to wells, contamination from animals is very possible due to inadequate drainage of waste and fecal water and the consequent contamination of groundwater. The obtained results are in accordance with the results of Kalaba et al. (2020) and indicate significant fecal contamination of water, especially intestinal enterococci. In relation to the results of Golić et al. (2021), a significantly higher percentage of unsatisfactory samples was determined. Observing the obtained results, it is observed that the presence of indicator organisms is greater in well water, while the number of microorganisms at 22°C and at 37°C is higher in water from water supply. Although the presence of coliform bacteria does not always indicate a threat to public health, their detection is a useful indication that water treatment operations should be investigated (Edberg, 2000).

CONCLUSION

Considering the presence of coliform bacteria, *Escherichia coli* and intestinal enterococci in water used in the food industry, there is a risk of microbiological contamination of food through water. This is particularly significant considering the share of well water in relation to the total water used in the food industry. For this reason, it is necessary to make effort to achieve the best possible quality of drinking water.

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

REFERENCES

- Dawson D. (1998): Water Quality for the Food Industry: An Introductory Manual CCRFA Guideline No. 21. Campden and Chorleywood Food Research Association.
- Dawson D. (2000): Water Quality for the Food Industry: Management and Microbiological Issues CCRFA Guideline No. 27. Campden and Chorleywood Food Research Association.
- 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*, 88:106-16.
- EU (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*, L435:1-62.
- Francisque A., Rodriguez M. J., Miranda-Moreno L. F., Sadiq R., Proulx F. (2009): Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water distribution system. *Water Res.*, 43:1075-87.
- Fridrich B., Kremer 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.
- Golic B., Kalaba V., Ilic T., Sladojevic Z. (2021): Review of microbiological analysis of water in meat, milk and fish production in the Republic of Srpska (Bosnia & Herzegovina) in the period 2018-2020. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 854(2021) 012031:1-5.
- Gottschal J. C. (1992): Substrate capturing and growth in various ecosystems. *J. Applied Bacteriol. Symp. Suppl.*, 73:39-48.
- 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*, 34:1659-65.
- 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.
- ISBIH (2003a): Water quality – Enumeration of culturable microorganisms – 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.
- Jaki V., Majnarić D., Lukačić M. (2010): The analysis of drinking water from the milk collection point in the Križevci area. In the 39th Croatian Symposium of Dairy Experts with International Participation, Book of Abstracts, 56-57.
- Kalaba V., Golić B., Ilić T. (2020): Microbiological safety of water in primary production of food. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 20(1-2):66-80.
- Kivaria F. M., Noordhuizen J. P. T. M., Kapaga A. M. (2006): Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. *Trop Anim Health Prod.*, 38(3):185-94.
- Liu G., Verberk J. Q., Van Dijk J. C. (2013): Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9265-76.
- Niquette P., Servais P., Savoir R. (2001): Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Res.*, 35:675-82
- Perkins N. R., Kelton D. F., Hand K. J., MacNaughton G., Berke O., Leslie K. E. (2009): An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. *J Dairy Sci.*, 92:3714-22.
- 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.
-

- Rulebook (2017): The Rulebook on the Health Safety of Water Intended for Human Consumption. The Official Gazette of Republic of Srpska, 88/17.
- 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*, 3:262-65.
- Terplan G. (1980): The role of water in the production and processing of milk. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B.*, 172(1-3):96-104.
- 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.

Paper received: 02.06.2023.

Paper accepted: 28.07.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301023Z

UDK 637.56'81:597.552.512

Оригинални научни рад

ЗНАЧАЈ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И Ц-РЕАКТИВНОГ ПРОТЕИНА КАО МОГУЋИХ БИОМАРКЕРА У ДИЈАГНОСТИЦИ МИКСОБОЛИЈАЗЕ ИЗАЗВАНЕ СА *Myxobolus cerebralis* КОД КАЛИФОРНИЈСКЕ ПАСТРМКЕ (*Oncorhynchus mykiss*)

Dimitrinka ZAPRYANOVA^{1*}, Cigdem URKU², Galin NIKOLOV³,
Alexander ATANASOFF¹

¹Универзитет Тракија, Факултет ветеринарске медицине, Стара Загора, Бугарска

²Универзитет у Истанбулу, Факултет наука о водама, Истанбул, Турска

³Универзитет Тракија, Пољопривредни факултет, Стара Загора, Бугарска

*Коресподентни аутор: Dimitrinka Zaprianova, zaprianowa@abv.bg

Сажетак

Myxobolus cerebralis је узрочник једне од најопаснијих болести (вртичавост) код салмонида. Припада подфилуму Мухозоа за који је најпријемчивија калифорнијска пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*). Протеини акутне фазе, као есенцијалне компоненте нормалне хомеостазе, потпуно су изучени и користе се као дијагностички и прогностички маркер за процену инфекције и запаљинских процеса код људи и животиња. Када је у питању патологија риба, значај и функција протеина акутне фазе још увек није у потпуности утврђена. Додатно, с обзиром да је, због недостатка специфичних дијагностичких тестова, паразитске инфекције теже дијагностиковати од бактеријских и вирусних, промена концентрације неких од протеина акутне фазе би се могла користити као алтернативни биомаркер за миксоболијазу. Да би се разумео дијагностички значај протеина акутне фазе код риба и да би се разликовале њихове вредности код различитих типова поремећаја неопходна су даља истраживања. У овој студији испитана је промена вредности церулоплазмина и Ц-реактивног протеина након инфламације изазване природном инфекцијом са *Myxobolus cerebralis* код калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*). Мерења су спроводена биохемијским и ензимским имуносорбентним тестом. Материјал за испитивање је укључивао болесне калифорнијске пастрмке са стопом морталитета од 45%. У будућности, протеини акутне фазе имају реални потенцијал да буду широко коришћени у дијагностиковању различитих болести код риба, јер промена њихове вредности може допринети бољој

дијагностици и лечењу, поготово када се промене јављају у току болести. Концентрација Ц-реактивног протеина код пастрмке може да послужи као индикатор здравственог стања. Потребна су додатна истраживања у циљу бољег разумевања дијагностичког значаја протеина акутне фазе код риба и тумачења различитих вредности концентрација код различитих поремећаја.

Кључне ријечи: Ц-реактивни протеин, церулоплазмин, *Myxobolus cerebralis*, калифорнијска пастрмка.

УВОД

Myxobolus cerebralis је паразит миксоспоридија присутан код салмонида, и то узгајаних и дивљих популација, а код којих узрокује вртичавост (енг: Whirling disease; скр: WD). Болест, која се јавља код рибе млађи, доводи до деформитета скелета и неуролошких поремећаја. Развојни циклус *M. cerebralis* карактерише животни циклус кроз два домаћина, бескичмењака олигохету *Tubifex tubifex* и кичмењака рибу из групе салмонида. Триактиномиксон споре *Myxobolus cerebralis* могу да продру у крајњег домаћина кроз кожу, шкрге, усну шупљину и пераја (Markiw, 1989; El-Matbouli и сар., 1995). Након везивања актиноспоре, спороплазме улазе у епителне ћелије рибе и почињу да се размножавају. Два дана након тога, ћелије секундарне спороплазме мигрирају у поткожно ткиво, затим у ћелије периферног нервног система и за неколико недеља стижу до ткива хрскавице (Sipos и сар., 2018). Потврдна дијагноза се заснива или на хистологији или на молекуларним методама, при чему је одобрена само једна утврђена PCR техника.

Одговор протеина акутне фазе је много више и детаљније проучен код виших у односу на ниже кичмењаке. Протеини акутне фазе (ПАФ) су супстанце које се синтетишу током акутног одговора на инфекцију, запаљински процес, стрес или оштећење ткива (Серón и сар., 2005; Petersen и сар., 2004). ПАФ, чија се концентрација у крви повећава за најмање 25% током инфламаторних процеса, називају се „позитивним“ ПАФ, док се „негативним“ ПАФ сматрају они чија се концентрације смањује у сличном односу (Gabay и Kushner, 1999). Даље, концентрација „позитивних“ ПАФ (као што су Ц-реактивни протеин и церулоплазмин) се повећава, док се ниво „негативних“ ПАФ (као што је албумин) смањује. Изразито позитивни ПАФ су они код којих се концентрације повећавају за 100-1000 пута у року од 1-2 дана, док су умерено позитивни ПАФ они код којих се концентрације повећава 5-10 пута, а незнатно позитивни су они ПАФ код којих се концентрација повећава између 50 и 100% (Roy и

сар., 2017). Такође, као одговор на инфламаторне стимулусе, концентрација негативних ПАФ, који се називају и акутни бустери, се смањује вероватно као резултат привремене повећане доступности слободних хормона који се везују за ове протеине (Ingenbleek и Young, 1994).

Производња и функција ПАФ се разликује код различитих врста животиња. Код риба, као и код сисара, хепатоцити су главни извор ПАФ (Güleç и Cengizler, 2012). Концентрације петраксина, којима припада Ц-реактивни протеин (ЦРП), после одговора акутне фазе код риба благо, расту или опадају (Ellis, 2001). ЦРП је најзначајнији ПАФ код кичмењака, укључујући кошљорибе у које спада и калифорнијска пастрмка (*Onchorhynchus mykiss*), а учествује у аглутинацији бактерија, активацији комплемента, активацији макрофага, инхибира раст неких бактерија и појачава фагоцитозу бактерија (Tirziu, 2009). Такође, Kodama и сар. (1999) указују да код калифорнијске пастрмке ЦРП појачава имуностимулативну активност ћелија бубрега, доводећи до појачане фагоцитне и хемокинетичке активности.

Церулоплазмин (Цп) је протеин акутне фазе чија се концентрација повећава као одговор на инфекцију, запаљински процес или друге факторе који оштећују ткиво. Главни извор су хепатоцити, али је могућа и синтеза на местима оштећења ткива (Szcubiał и сар., 2012). Има способност да смањи оксидацију липида, уклања супероксида и ослобађа јона бакра, а такође врши оксидацију Fe_2^+ у Fe_3^+ (Tapryal и сар., 2009). Промене у концентрацији Цп код пастрмке могу бити од значаја за рано откривање миксоболијазе изазване *Myxobolus cerebralis* и заједно са резултатима о концентрацији ЦРП могу се користити као параметри за рану дијагностику, која се може успоставити пре предузимања одговарајуће терапије. Стога је циљ овог истраживања да се сагледају промене у концентрацијама ЦРП и церулоплазмине код калифорнијске пастрмке (*Onchorhynchus mykiss*) током природне инфекције изазване *Myxobolus cerebralis*, као и могућност њиховог коришћења као маркера за миксоболијазе.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Оболела калифорнијска пастрмка (5-10 g) добијена је из рибњака у близини Пловдива, у Бугарској, где је забележен морталитет од 45%. Узорци крви су узети са репа на задњој страни аналне пераје потпуно одечене помоћу сечива скалпела. Биохемијски параметри су одређивани на потпуно аутоматском уређају за биохемијске анализе у ветерини Mindray BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics, Кина), коришћењем стандардних лабораторијских

комплета које је испоручио Biolabo SAS (Француска). Метода одређивања церулоплазмينا заснива се на мерењу активности оксидазе коју церулоплазмин (Цп) показује са п-фенилендиамином (ППД). Обојени оксидациони производ настаје оксидацијом ППД помоћу Цп применом Ревинове методе описане од стране Bestuјеva и Kolb. Комплет за ELISA ЦПП високе осетљивости за рибе (енг: Fish high sensitivity C-Reactive Protein; скр: hs-CRP) је претходно обложен специфичним hs-CRP антителом. У бунарчиће за узорке додато је 10 µl узорака разблаженог у 40 µl пуфера за разблаживање, затим су узорци инкубирани на 37°C током 30 минута и 5 пута испрани раствором за испирање. 50 µl ЦПП - коњугованог реагенса је додато у сваки бунарчић и плоче су инкубиране 30 минута на 37°C. Невезани коњугат је испран и 50 µl раствора хромогена А и 50 µl раствора хромогена Б је додато у сваки бунарчић, а затим инкубиран на 37°C током 15 минута. Ензимска реакција је заустављена додавањем 50 µl стоп раствора у сваки бунарчић. Оптичка густина је мерена на 450 nm.

Статистичка анализа резултата је спроведена коришћењем једносмерне анализе варијансе (ANOVA). Добијени резултати су обрађени помоћу софтвера Statistica v.6.1 (StatSoft Inc.) и представљени као средња вредност и стандардна грешка средње вредности (Средња вредност±Стандардна грешка). Статистичка значајност параметара одређена је LSD Posthoc тестом при вредности $P < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Инфекције миксозоама разликују се по начину инфекције, путу којим паразит стиже до циљног ткива, самом циљном ткиву и симптомима болести код пацијента. У одређеним случајевима, као што је код инфекције са *M. cerebralis*, када паразит мигрира кроз заштићене путеве, одговор специфичног антитела је одложен (Holzer и сар., 2021), а такође се претпоставља да домаћин вероватно не може да одговори на инфекцију све док паразит не изазове довољно оштећења хрскавичном ткиву када бива изложен одбрамбеним механизмима домаћина. Рибе испољавају имунску реакцију против унутрашњих и спољашњих агенаса, а која укључује активацију како урођеног тако и стеченог имунитета (Gruys и сар., 2005). Урођени имунски систем код риба се активира као одговор на инфламаторне стимулусе активацијом фагоцита, стимулисањем активности белих крвних зрнаца и променом концентрације протеина акутне фазе (Roy и сар., 2017).

Ц-реактивни протеин је део урођеног имунског одговора и има кључну улогу у аглутинацији страних микроорганизама, везивању за фосфатидилхолин

на површини микроорганизма, активацији фагоцитозе и класичне каскадне реакције комплемента (Nag и сар., 2004). Резултати Liu и сар. (2004) указују да се синтеза ЦРП код калифорнијске пастрмке детектује углавном у хепатоцитима, макрофагима бубрега, лимфоцитима слезине и лимфоцитима периферне крви. За разлику од људи и сисара, код риба су концентрације ЦРП релативно високе. Код риба се пентраксини обично налазе у вишим концентрацијама у серуму, а различити су код различитих врста риба (Ellis, 2001), па су те вредности код ораде (*Pagrus auratus*) – 54 µg/ml (Cook и сар., 2003), рибе листа (*Pleuronectes plates*) – 55 µg/ml (Pathak и Agrawal, 2019), морског пса (*Mustelus canis*) – 400 µg/ml (Robey и сар., 1983), листа (*Cynoglossus semilaevis*) – 7,6 µg/ml (Li и сар., 2013). Физиолошки распон концентрације ЦРП у серуму калифорнијске пастрмке је 30-88 µg/ml (Liu и сар., 2004; Kodama и сар., 2004; Pathak и Agrawal, 2019). У нашем истраживању, као одговор на инвазију паразита, ниво ЦРП код оболелих риба ($481 \pm 5,11$ µg/ml) је био виши него код здравих ($36,6 \pm 0,11$ µg/ml). Ови подаци су у складу са ранијим литературним подацима, где се ниво ЦРП значајно повећао недељу дана након инвазије, а затим се смањило на вредности испод физиолошких (Hoole и сар., 2003; Roy и сар., 2017). Saheb и сар. (2020) су саопштили да се концентрација ЦРП повећава зависно од типа паразитске инфекције протозоама, а та вредност се може користити као неспецифичан индикатор код клиничког испитивања.

У нашем испитивању утврђен је ефекат *M. cerebralis* не само на ЦРП већ и на вредности Цп. Као и код сисара, главна улога Цп код риба је транспорт бакра у крви (Sieroslawska и сар., 2012). Улога Цп је слична улози интерферона и трансферина; инхибира развој бактерија тако што им одузима неке хранљиве материје, тј. јоне бакра. Примећено је да вредност Цп, као протеина акутне фазе, расте под утицајем различитих штетних фактора. Концентрација Цп здраве калифорнијске пастрмке у нашем раду (11-36 mg/dL) била је близу оних утврђених у ранијим радовима 13,43-15,48 mg/% (Ispir и Dorucu, 2005; Yonar и сар., 2010) док је вишеструко повећање ($145,39 \pm 23,17$ mg/L) утврђено код пастрмке заражене са *M. cerebralis*. Неки аутори су приметили значајно повећање активности Цп након интоксикације шарана и млађи сибирске јесетре заражене ларвом *Diplostomum sp*, као и код сибирске јесетре након давања епин-раствора (Kolman, 2001; Sieroslawska и сар., 2012). Инфекција са *A. hydrophila* код тилапија довела је до значајног пораста нивоа Цп у крви (Charlie-Silva и сар., 2019), као и инфекција калифорнијске пастрмке патогенима (Perrier и сар., 1974) и европске јегуље (*Anguilla anguilla*) нематодом (Terech-Majewska и сар., 2015). Слично, у овој студији је забележено повећање концентрације Цп код пастрмке инфициране са *M. cerebralis*. У студији коју су

спровели Kumar и сар. (2017) утврђено је да је промена нивоа Цп повезана са степеном инфекције и његово повећање је највероватније последица одговора на инвазију паразита која утиче на јетру да синтетише позитивне ПАФ-ове како би одржали стабилну унутрашњу средину. Такође, може се претпоставити да Цп има антипаразитску улогу код риба, а што може бити предмет даљег истраживања.

ЗАКЉУЧАК

Протеини акутне фазе имају у будућности реални потенцијал да постану широко коришћени у дијагностици различитих болести код риба, јер процена њихових концентрација може помоћи бољој дијагнози и лечењу, посебно када се јављају током трајања болести. Мерење концентрације ЦРП код пастрмке може се користити као биоиндикатор здравственог стања ове врсте.

Захвалница

Овај рад је подржан фондовима Trakia University (број пројекта НП4-21).

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

ЛИТЕРАТУРА

- Cerón J. J., Eckersall P. D., Martínez-Subiela S. (2005): Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2):85-99.
- Charlie-Silva I., Klein A., Gomes J. M. M., Prado E. J. R., Moraes A. C., Eto S. F., Fernandes D. C., Fagliari J. J., Corrêa Junior J. D., Lima C., Lopes-Ferreira M., Conceição K., Manrique W. G., Belo M. A. A. (2019): Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. *Sci. Rep.*, 9:4776.
- Cook M. T., Hayball P. J., Birdseye L., Bagley C., Nowak B. F., Hayball J. D. (2003): Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae*) serum. *Dev Comp Immunol*, 27(6-7):579-588.
- Ellis A. E. (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:827-839.
- El-Matbouli M., Hoffmann R. W., Mandok C. (1995): Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J. Fish Biol.*, 46:919-935.
-

- Gabay C., Kushner I. (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 340(6):448-454.
- Gruys E., Toussaint M. J. M., Niewold T. A., Koopmans S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science B*. 6(11):1045-1056.
- Güleç A., Cengizler I. (2012): Determination of acute phase proteins after experimental *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36(4):380-387.
- Holzer A. S., Piazzon M. C., Barrett D., Bartholomew J. L., Sitjà-Bobadilla A. (2021): To react or not to react: The dilemma of fish immune systems facing Myxozoan infections. *Front. Immunol.*, 12:734238.
- Hoole D., Lewis J., Schuwerack P., Chakravarthy C., Shrive A., Greenhough T., Cartwright J. (2003): Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: A role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology*, 126(7):S71-85.
- Ingenbleek M., Young V. (1994): Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann Rev Nutr.*, 14:495-533.
- Ispir U., Dorucu M. (2005): A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29:1169-1176.
- Kodama H., Arimitsu H., Mukamoto M., Sugimoto C. (1999): Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein. *Am J Vet Res.*, 60(2):240-244.
- Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. (2004): Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:589-597.
- Kolman H. (2001): The humoral effects of epin in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Archives of Polish Fisheries*, 9(1):61-69.
- Kumar S., Raman R., Pani Prasad K., Srivastava P., Kumar S., Rajendran K. (2017): Modulation of innate immune responses and induction of oxidative stress biomarkers in Pangasianodon hypophthalmus following and experimental infection with dactylogyrid monogeneans. *Fish & Shellfish Immunology*, 63:334e343.
- Li M., Chen C., Li J., Sun L. (2013): The C-reactive protein of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* is an acute phase protein that interacts with bacterial pathogens and stimulates the antibacterial activity of peripheral blood leukocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2):623-631
-

- Liu Y., Iwasaki T., Watarai S., Kodama H. (2004): Effect of turpentine oil on C-reactive protein production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 17(3):203-210.
- Markiw M. E. (1989): Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, 6:7-10.
- Nag K., Capote K., Panda A. K., Frederick L., Hearn S. A., Petersen N. O., Schürch S., Possmayer F. (2004): Disparate effects of two phosphatidylcholine binding proteins, C-reactive protein and surfactant protein A, on pulmonary surfactant structure and function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 287:L1145-1153.
- Pathak A., Agrawal A. (2019): Evolution of C-reactive protein. *Front. Immunol., Sec. Molecular Innate Immunity*, 10:00943.
- Perrier H., Delcroix J. P., Perrier C., Gras J. (1974): Disc electrophoresis of plasma proteins of fish. Physical and chemical characters; localization of fibrinogen, transferrin and ceruloplasmin in the plasma of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson), *Comp. Biochem. Physiol.*, 49:679-685.
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35(2):163-187.
- Robey F. A., Tanaka T., Liu T. Y. (1983): Isolation and characterization of two major serum proteins from the dogfish *Mustelus canis*, C-reactive protein and amyloid P component. *J Biol Chem.*, 258(6):3889-3894.
- Roy S., Kumar V., Behera B. K. (2017): Acute phase proteins and their potential role as an indicator for fish health and in diagnosis of fish diseases. *Protein & Peptide Letters*, 24:1-13.
- Saheb E. J., Kuba R., Musa I. S. (2020): The role of C-reactive protein in the infections caused by parasites (Review). *Diyala Journal of Medicine*, 19(2):157-164.
- Sieroslawska A., Rymuszka A., Velisek J., Pawlik-Skowronska B., Svobodova Z., Skowronski T. (2012): Effects of microcystin-containing cyanobacterial extract on hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol Biochem.*, 38:1159-1167.
- Sipos D., Ursu K., Dán Á., Herczeg D., Eszterbauer E. (2018): Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLoS One*, 13(9):e0204437.
- Szczubiał M., Dąbrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Komar M. (2012): Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different pathogens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2):291-296.

- Tapryal N., Mukhopadhyay C., Das D., Fox P. L., Mukhopadhyay C. K. (2009): Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its 3'-untranslated region. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(3):1873-1883.
- Terech-Majewska E., Schulz P., Siwicki A. (2015): Influence of nematode *Anguillicoloides crassus* infestation on the cellular and humoral innate immunity in European eel (*Anguilla anguilla*). *Cent. Eur. J. Immunol.*, 40:127-131.
- Tîrziu E. (2009): Acute-phase proteins in immune response. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară, Timișoara*, 42(1):329-339.
- Yonar M., Sağlam N., İspir U. (2010): Effect of sulfamerazine on plasma ceruloplasmin levels in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Science & Technology*, 5(2):79-84.

Рад примљен: 31.05.2023.
Рад прихваћен: 03.09.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301032Z

UDK 637.56'81:597.552.512

Original Scientific Paper

THE SIGNIFICANCE OF CERULOPLASMIN AND C-REACTIVE PROTEIN AS POSSIBLE MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF MYXOBOLOUS INFECTION CAUSED BY *Myxobolus cerebralis* IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Dimitrinka ZAPRYANOVA^{1*}, Cigdem URKU², Galin NIKOLOV³,
Alexander ATANASOFF¹

¹Trakia University, Faculty of Veterinary medicine, Stara Zagora, Bulgaria

²Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Istanbul, Türkiye

³Trakia University, Faculty of Agriculture, Stara Zagora, Bulgaria

*Corresponding author: Dimitrinka Zapryanova, zapryanowa@abv.bg

Summary

Myxobolus cerebralis is the etiological agent of one of the most devastating diseases (*Whirling disease*) in salmonids. It belongs to subphylum Myxozoa which possesses the highest susceptibility to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acute phase proteins as an essential component of normal homeostasis are well defined and are presently used as a diagnostic and prognostic marker in human and animal pathology for evaluation of infection and inflammation. In piscine medicine the importance and the function of acute phase proteins still has not been fully determined. Furthermore, parasitic infections are more difficult to diagnose than bacterial and viral infections due to the lack of specific diagnostic tools therefore the change in the levels of some acute phase proteins could possibly be used as an alternative marker for myxobolosis. Further research is still needed to develop an understanding of the diagnostic significance of acute phase proteins in fish and the differentiation of their values in different types of disorders. The present study evaluated the modulation of ceruloplasmin and C-reactive protein following inflammatory stimulus by natural infection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In the research, biochemical tests and enzyme-linked immunosorbent assay were carried out. The test material was a diseased rainbow trout with a mortality rate of 45%. In the future, acute phase proteins have a real potential to become widely used as diagnostic tools in piscine medicine, as the evaluation of their levels can help better diagnosis and treatment, especially when

it occurs during illness. Measurement of C-reactive protein concentration in trout may be used useful as a bioindicator of the health condition of this species. Further research is still needed to develop an understanding of the diagnostic significance of acute phase proteins in fish and the differentiation of their values in different types of disorders.

Key words: C-reactive protein, ceruloplasmin, *Myxobolus cerebralis*, rainbow trout.

INTRODUCTION

Myxobolus cerebralis is a myxosporean parasite of salmonids that causes Whirling disease (WD) in farmed and wild populations. The disease, which occurs in juvenile fish, leads to skeletal deformities and neurological disturbances. The developmental cycle of *M. cerebralis* has two-host life cycle, tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex* and salmonid fishes. Triactinomyxon spores of *Myxobolus cerebralis* (*M. cerebralis*) can penetrate the final host through the skin, gills, mouth cavity and fins (Markiw, 1989; El-Matbouli et al., 1995). After attachment of the actinospore, the sporoplasms enter the epithelial cells of the fish and begin to multiply. Two days after that, the secondary sporoplasm cells migrate to the subcutaneous tissue, then into the cells of the peripheral nervous system, and within weeks reach the cartilage tissue (Sipos et al., 2018). Confirmatory diagnosis is based on either histology or molecular-based methods, with only one nested PCR technique has been approved. The acute phase response in higher vertebrates is more detailed and better studied than in lower vertebrates. The acute phase proteins (APPs) are substances synthesized during an acute phase response in the body, which may be the result of an infection, inflammation, stress or tissue damage (Cerón et al., 2005; Petersen et al., 2004). An APP whose blood concentration enhances by at least 25% during inflammatory processes are called “positive” APP and “negative” APP when they decrease in similar proportions (Gabay and Kushner, 1999) and furthermore, an increase in the concentration of “positive” APPs (such as C-reactive protein and ceruloplasmin) while “negative” APPs (such as albumin) levels decrease. Further, when the levels rise of 100-1000 folds within 1-2 days they are assigned to the highly positive APPs; at an increase of 5-10 times are called moderate APP and when increasing between 50 to 100 % are minor APP (Roy et al, 2017). Also, as a response to inflammatory stimuli, the concentration of negative APPs which are also described as acute booster reagents, decreases possibly as a result of provisional amplification in free hormones availability bound to these proteins (Ingenbleek and Young, 1994).

The formation and function of APP may differ depending on the animal species. In fish such as in mammals, hepatocytes are the prime source of APPs (Güleç and Cengizler, 2012). In fish, concentrations of petraxins, to which CRP belongs, following an acute phase response rise slightly or decrease (Ellis, 2001). CRP is the most important APP characteristic of vertebrates, including teleostean fishes, and is regarded as the basic APP for them, described in many species, including rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which takes part in bacterial agglutination, complement activation, activation of macrophages, inhibits the growth of some bacteria, emphasizes bacterial phagocytosis (Tirziu, 2009). Also, Kodama et al. (1999) reveal that in rainbow trout CRP has immunostimulating activity for head kidney cells which leads to increased phagocytic and chemokinetic activity.

Ceruloplasmin (Cp) is an acute-phase protein whose concentration increases in response to infection, inflammation, or other tissue-damaging factors. The main source is hepatocytes, but it is also possible to synthesize at the sites of tissue damage (Szczubiał et al., 2012). It has the ability to suppress lipid oxidation, the ability to scavenge superoxide and release free copper ions, and also oxidize Fe_2^+ to Fe_3^+ (Tapryal et al., 2009). The changes in Cp concentration of trout could be of significance for early detection of myxobolosis caused by *Myxobolus cerebralis* and together with CRP results could be used as parameters for diagnosis before therapeutic procedures are undertaken. Therefore, the purpose of the present study was to observe changes in the CRP and ceruloplasmine concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) within a natural infection caused by *Myxobolus cerebralis* as well as possibility to use them as a marker for myxobolosis.

MATERIALS AND METHODS

The diseased rainbow trout (5-10 g) were obtained from a fish farm near Plovdiv, Bulgaria, that registered 45% mortality. The blood samples were taken from the tail at the back of the anal fin by completely severed using a scalpel blade. Biochemical parameters were measured on the veterinary biochemistry automated system Mindray BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics, China), using standard lab kits supplied by Biolabo SAS (France). The method of ceruloplasmin determination is based on oxidase activity that ceruloplasmin shows with p-phenylenediamine. A colored oxidation product is formed from the oxidation of PPD by Cp using Revin's method described by Bestujeva and Kolb. Fish high sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP) ELISA Kit were pre-coated with an antibody specific to hs-CRP. In sample wells, 10 μl samples diluted in 40 μl sample dilution buffer are added, incubated at 37°C for 30 min, and washed 5 times with wash solution. 50 μl CRP –

conjugated reagent was added to each well and plates were incubated for 30 min at 37°C. Unbound conjugated was washed off and 50 µl Chromogen Solution A and 50 µl Chromogen Solution B was added to each well and incubated at 37°C for 15 minutes. The enzymatic reaction was stopped by adding 50 µl stop solution to each well. The optical density was measured at 450 nm.

The statistical analysis of the results was carried out using one way analysis of variance (ANOVA). The results obtained from the investigation were processed with software Statistica v.6.1 (StatSoft Inc.) and are presented as mean and standard error of the mean (Mean±Error). The statistical significance of parameters was determined by the Posthoc procedure LSD test at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Myxozoan infections differ in mode of infection, the route by which the parasite reaches its target, target tissue, and the appearance in a patient of disease. In certain cases, such as *M. cerebralis* infection, as the parasite migrates to protected pathways, the specific antibody response is delayed (Holzer et al., 2021) and also it is assumed that possibly the host cannot respond to the infection until the parasite has caused enough damage to the cartilage tissue to allow it to be exposed to the host's defenses. In fish, against internal and external changes, an immunological reaction occurs, which includes activation of both innate and acquired immune response (Gruys et al., 2005). The innate immune system of fish is involved in the response to inflammatory stimuli by activation of phagocytes, stimulating white blood cells activity and changing the concentrations of the acute phase proteins (Roy et al., 2017).

C-reactive protein is part of the innate immune defense system and has a key role in agglutination of foreign microbes, binding to phosphatidylcholine on microbes, activation of phagocytosis and the classical complement cascade (Nag et al., 2004). The results of Liu et al. (2004) indicates that the production of CRP in rainbow trout is detected mainly in hepatocytes, head kidney macrophages, spleen lymphocytes and peripheral blood lymphocytes. Unlike humans and mammals, the CRP levels in fish species are relatively high. In fish, pentraxins are commonly found to be in higher concentrations in serum are different for different fish species (Ellis, 2001), like as snapper (*Pagrus auratus*) - 54 µg/ml (Cook et al., 2003), plaice (*Pleuronectes plates*) – 55 µg/ml (Pathak and Agrawal, 2019), smooth dogfish (*Mustelus canis*) – 400 µg/ml (Robey et al., 1983), tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) - 7.6 µg/ml (Li et al., 2013). The normal serum ranges of CRP concentration in rainbow trout

between 30-88 $\mu\text{g/ml}$ (Liu et al., 2004; Kodama et al., 2004; Pathak and Agrawal, 2019). In the current study, CRP level in diseased fish ($481 \pm 5.11 \mu\text{g/ml}$) was higher than healthy one ($36.6 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$) response to parasite's invasion. These data are consistent with earlier reports, where CRP level increased significantly at one weeks after invasion then decreased to below normal (Hoole et al., 2003; Roy et al., 2017). Saheb et al. (2020) reported that concentration of CRP elevates depending on the protozoa parasitic infection and the value can be used as a non-specific indicator of examination of the clinical presentation.

The effect of *M. cerebralis* of not only on CRP but in Cp levels was observed in present survey. In fish, the main function of Cp, like in mammals is copper transport in the blood (Sieroslawska et al., 2012). The role of ceruloplasmin is similar to that of interferon and transferrin; it inhibits bacterial development by depriving it of some nutrients, i.e. copper ions. It was noted that as an acute phase protein, Cp rises as a result of harmful factors. According to the our data, ceruloplasmin concentration of healthy rainbow trout (11-36 mg/dL) was closed to the previous reports 13,43-15,48 mg/% (Ispir and Dorucu, 2005; Yonar et al., 2010) while a multiple increase ($145.39 \pm 23.17 \text{ mg/L}$) was found in trout infected with *M. cerebralis*. Some authors observe marked increase in ceruloplasmin activity after intoxication in common carp and Siberian sturgeon fry infested with *Diplostomum* sp. larvae, as well as in Siberian sturgeon after epin-solution (Kolman, 2001; Sieroslawska et al., 2012). *A. hydrophila* infection in tilapias resulted in a significant rise in the blood levels of ceruloplasmin (Charlie-Silva et al., 2019) as well as were elevated after infection with pathogens in the rainbow trout (Perrier et al., 1974), in European eel (*Anguilla anguilla*) infested with nematode (Terech-Majewska et al., 2015). Similarly, in the present study an increase in the concentration of Cp was noted in trout infected with *M. cerebralis*. In the study conducted by Kumar et al. (2017) it is revealed that the change in Cp levels is related to the degree of infection and its increase is most likely due to the response to parasite invasion targeting the liver to synthesize positive APPs to maintain a stable internal environment. Also, it can be assumed that Cp probably has an antiparasitic role in fish that needs to be studied in detail.

CONCLUSION

In the future, acute phase proteins have a real potential to become widely used as diagnostic tools in piscine medicine, as the evaluation of their levels can help better diagnosis and treatment, especially when it occurs during illness. Measurement of CRP concentration in trout may be used useful as a bioindicator of the health condition of this species.

Acknowledgment

This work was supported by the funds of the Trakia University (grant number HII4-21).

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

REFERENCES

- Cerón J. J., Eckersall P. D., Martínez-Subiela S. (2005): Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2):85-99.
- Charlie-Silva I., Klein A., Gomes J. M. M., Prado E. J. R., Moraes A. C., Eto S. F., Fernandes D. C., Fagliari J. J., Corrêa Junior J. D., Lima C., Lopes-Ferreira M., Conceição K., Manrique W. G., Belo M. A. A. (2019): Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. *Sci. Rep.*, 9:4776.
- Cook M. T., Hayball P. J., Birdseye L., Bagley C., Nowak B. F., Hayball J. D. (2003): Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae*) serum. *Dev Comp Immunol*, 27(6-7):579-588.
- Ellis A. E. (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:827-839.
- El-Matbouli M., Hoffmann R. W., Mandok C. (1995): Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J. Fish Biol.*, 46:919-935.
- Gabay C., Kushner I. (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 340(6):448-454.
- Gruys E., Toussaint M. J. M., Niewold T. A., Koopmans S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science B*. 6(11):1045-1056.
- Güleç A., Cengizler I. (2012): Determination of acute phase proteins after experimental *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36(4):380-387.
- Holzer A. S., Piazzon M. C., Barrett D., Bartholomew J. L., Sitjà-Bobadilla A. (2021): To react or not to react: The dilemma of fish immune systems facing Myxozoan infections. *Front. Immunol.*, 12:734238.
- Hoole D., Lewis J., Schuwerack P., Chakravarthy C., Shrive A., Greenhough T.,
-

- Cartwright J. (2003): Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: A role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology*, 126(7):S71-85.
- Ingenbleek M., Young V. (1994): Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann Rev Nutr.*, 14:495-533.
- Ispir U., Dorucu M. (2005): A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29:1169-1176.
- Kodama H., Arimitsu H., Mukamoto M., Sugimoto C. (1999): Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein. *Am J Vet Res.*, 60(2):240-244.
- Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. (2004): Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:589-597.
- Kolman H. (2001): The humoral effects of epin in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Archives of Polish Fisheries*, 9(1):61-69.
- Kumar S., Raman R., Pani Prasad K., Srivastava P., Kumar S., Rajendran K. (2017): Modulation of innate immune responses and induction of oxidative stress biomarkers in *Pangasianodon hypophthalmus* following and experimental infection with dactylogyrid monogeneans. *Fish & Shellfish Immunology*, 63:334e343.
- Li M., Chen C., Li J., Sun L. (2013): The C-reactive protein of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* is an acute phase protein that interacts with bacterial pathogens and stimulates the antibacterial activity of peripheral blood leukocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2):623-631
- Liu Y., Iwasaki T., Watarai S., Kodama H. (2004): Effect of turpentine oil on C-reactive protein production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 17(3):203-210.
- Markiw M. E. (1989): Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, 6:7-10.
- Nag K., Capote K., Panda A. K., Frederick L., Hearn S. A., Petersen N. O., Schürch S., Possmayer F. (2004): Disparate effects of two phosphatidylcholine binding proteins, C-reactive protein and surfactant protein A, on pulmonary surfactant structure and function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 287:L1145-1153.
- Pathak A., Agrawal A. (2019): Evolution of C-reactive protein. *Front. Immunol., Sec. Molecular Innate Immunity*, 10:00943.

- Perrier H., Delcroix J. P., Perrier C., Gras J. (1974): Disc electrophoresis of plasma proteins of fish. Physical and chemical characters; localization of fibrinogen, transferrin and ceruloplasmin in the plasma of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson), *Comp. Biochem. Physiol.*, 49:679-685.
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35(2):163-187.
- Robey F. A., Tanaka T., Liu T. Y. (1983): Isolation and characterization of two major serum proteins from the dogfish *Mustelus canis*, C-reactive protein and amyloid P component. *J Biol Chem.*, 258(6):3889-3894.
- Roy S., Kumar V., Behera B. K (2017): Acute phase proteins and their potential role as an indicator for fish health and in diagnosis of fish diseases. *Protein & Peptide Letters*, 24:1-13.
- Saheb E. J., Kuba R., Musa I. S. (2020): The role of C-reactive protein in the infections caused by parasites (Review). *Diyala Journal of Medicine*, 19(2):157-164.
- Sieroslawska A., Rymuszka A., Velisek J., Pawlik-Skowronska B., Svobodova Z., Skowronski T. (2012): Effects of microcystin-containing cyanobacterial extract on hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol Biochem.*, 38:1159-1167.
- Sipos D., Ursu K., Dán Á., Herczeg D., Eszterbauer E. (2018): Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLoS One*, 13(9):e0204437.
- Szczubiał M., Dąbrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Komar M. (2012): Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different pathogens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2):291-296.
- Tapryal N., Mukhopadhyay C., Das D., Fox P. L., Mukhopadhyay C. K. (2009): Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its 3'-untranslated region. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(3):1873-1883.
- Terech-Majewska E., Schulz P., Siwicki A. (2015): Influence of nematode *Anguillicoloides crassus* infestation on the cellular and humoral innate immunity in European eel (*Anguilla anguilla*). *Cent. Eur. J. Immunol.*, 40:127-131.
- Tîrziu E. (2009): Acute-phase proteins in immune response. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară, Timișoara*, 42(1):329-339.
- Yonar M., Sağlam N., İspir U. (2010): Effect of sulfamerazine on plasma
-

ceruloplasmin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Science & Technology*, 5(2):79-84.

Paper received: 31.05.2023.

Paper accepted: 03.09.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301041D

UDK 636.066:591.5:378.4.01

Оригинални научни рад

ИСТРАЖИВАЊЕ О МИШЉЕЊУ СТУДЕНАТА ПРВЕ И ЗАВРШНЕ ГОДИНЕ ФАКУЛТЕТА ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ О ПРАВИМА И ДОБРОБИТИ ЖИВОТИЊА

Дајана ДАВИТКОВ, Бранислав ВЕЈНОВИЋ, Вишња ЈОВАНОВИЋ,
Дарко ДАВИТКОВ, Софија ШОЛАЈА, Јелена АЛЕКСИЋ
РАДОЈКОВИЋ*

Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

* Коресподентни аутор: Јелена Алексић Радојковић, alexjellena@vet.bg.ac.rs

Сажетак

У данашње време улога животиња у друштву је промењена. Животиње се више не посматрају као власништво, већ као жива бића. Када је у питању ветеринарска медицина, такође постоје промене у интересовањима између мушкараца и жена, као и професионалним преференцијама. Студије су показале да пол и брига за добробит животиња такође утичу на ниво забринутости за здравље животиња. Циљ овог истраживања био је да се процени разлика у мишљењу између студената прве и завршне године ветеринарске медицине у односу на етичке дилеме и добробит животиња. У истраживање је укључено укупно 200 студената ветеринарске медицине прве и завршне године. *Survey Monkey* је коришћен за прикупљање информација, а анкета се састојала од десет питања. Резултати су подељени на демографске податке, етичке дилеме у области права животиња и мишљење о еутаназији. Није установљена статистички значајна разлика између односа полова и места одрастања испитиваних студената. Скоро половина студената прве године (49%) исказала је жељу да ради са социјалним животињама, а само 11% са фармским животињама. Када је реч о студентима завршне године, већина њих такође жели да ради са социјалним животињама (36%), али постоји и интересовање за рад са фармским животињама (20%). На разлике у мишљењу о правима животиња и еутаназији више је утицао пол студената у поређењу са годином студија. Истраживање је показало да у популацији студената постоји смањена заинтересованост за бављење праксом фармских животиња, и да је то област којој треба посветити више пажње. Такође, неопходно је више

усмеравати студенте за области њиховог интересовања током студирања, да би када стекну диплому могли одмах знати у којој области ветеринарске делатности желе да раде.

Кључне речи: анкета, добробит животиња, права животиња, студенти.

УВОД

Током историје улога животиња у животу људи се мењала. Данас се све већи значај придаје етичким питањима и проблемима фармских, репродуктивних и лабораторијских животиња. Одлука о студирању ветеринарске медицине често се доноси у младости због наклоности према животињама (Serpell, 2005). Данас, у ветеринарској професији више не доминирају мушкарци. На пример, у Аустралији 80% дипломираних студената су жене (Porritt, 2013). Промена односа у половима у ветеринарској медицини условила је промене преференција у каријери (Lofstedt, 2003).

Подаци из литературе указују да у првим годинама студија студенти показују већу забринутост за добробит и здравље животиња (Paul и Podberscek, 2000). Такође, америчка студија о болу код животиња је показала да би студенти прве године радије лечили животиње од бола у поређењу са студентима виших година студија. Занимљив налаз је и да поглед на добробит животиња може да се промени похађањем курсева о добробити животиња, што су доказали Hazel и сар. (2011).

Студије су показале да пол и брига за добробит животиња такође утичу на ниво емпатије према здрављу животиња (Cornish и сар., 2016). Висок ниво емпатије према животињама је био присутнији код жена у поређењу са мушкарцима (Izmirli и сар., 2014). Промене у односу полова нису једини елемент који указује на различите погледе на етичке дилеме код студената, већ су важан део многих студија била и професионална интересовања. Студенти који желе да раде са фармским животињама показују мање емпатије у поређењу са студентима који желе да раде са социјалним животињама (Levine и сар., 2005). Последњих година свест људи је све већа у погледу значаја и важности здравља, заштите и добробити животиња, а улога студената ветеринарске медицине је значајна, јер ће се наћи у свакодневним етичким дилемама у вези са животињама и њиховим држаоцима односно власницима.

Циљ ове студије је био да се истражи разлика између студената прве и завршне године ветеринарске медицине у мишљењу о етичким дилемама као што

је еутаназија и да се испита да ли постоје разлике у демографији, каријери и степену студија које би утицале на њихов став о добробити и правима животиња.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Анкета је спроведена на 200 студената (100 студената прве и 100 студената завршне године) Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Упитник је дизајниран да истражи професионалне интересе, мишљење студената о еутаназији и правима животиња. Анкета је направљена коришћењем *Survey monkey* и била је доступна *online* у периоду од 1. новембра до 1. децембра 2021. године. За ову студију прибављено је одобрење Етичке комисије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (Мишљење бр. 1/21).

Сви студенти завршне године студија су већ похађали предмете Понашање, добробит и заштита животиња и Етика и комунологија у ветеринарској медицини, а студенти прве године само предмет Понашање, добробит и заштита животиња. За све учеснике је загарантована анонимност.

Упитник се састојао од десет питања. Прва два питања била су демографска питања (пол и место становања), а треће питање се бавило професионалним интересима. Следећих седам питања биле су етичке дилеме о правима животиња и еутаназији. Сви подаци су проверени на грешке и статистичка анализа је извршена коришћењем *GenStat* софтвера.

РЕЗУЛТАТИ

СТУДЕНТИ ПРВЕ ГОДИНЕ

Демографски подаци

Од укупно 100 студента прве године студија било је 33% мушкарца и 67% жена. Сви студенти су били у првом семестру студија. Из градског подручја је било 70% студената, а из сеоског 30% студената. За професионално интересовање, већина испитаних студената одабрала је рад са кућним љубимцима (49%). Фармске животиње су биле први избор за 11% студената, 4% студената изабрало је инспекцијски рад, 4% су желели да се баве научноистраживачким радом, један је желео да ради у области хигијене намирница анималног порекла, а 31% студената је било неопредељено.

Етичке дилеме у вези са правима животиња и еутаназијом

Од укупно 100 студената прве године на питање да ли мисле да ветеринари и студенти ветеринарске медицине имају довољно емпатије према животињама мишљење је подељено. Већина (73%) сматра да у ветеринарској струци постоји емпатија према животињама, а 27% сматра да у ветеринарској професији нема довољно емпатије према животињама.

За мишљење о еутаназији, студентима су постављена два питања. Прво је било етичка дилема: да ли ће еутаназирати здраву животињу само на захтев власника. На ово питање, 67% студената је одговорило да не би еутаназирало здраву животињу, а 33% би спровело еутаназију. Друго питање је било да ли ће еутаназирати животињу која је испољила агресивно понашање. Укупно 43% испитаника би еутаназирало агресивну животињу, а 57% се не би одлучило за еутаназију, иако је животиња агресивна.

Трећи сет питања односио се на права животиња. На питање да ли треба више да брину о животињама или власнику приликом доношења одлука, 72% студената је рекло да би примарно бринули за животињу, а 28% би примарно поштовали жеље власника. На друго питање у трећем сету, студентима је постављено питање да ли наставни план и програм на факултету посвећује довољно времена етици и добробити животиња. Укупно 40 (41%) испитаника је сматрало да је овим предметима посвећено довољно времена, а 59 (59%) сматра да би добробит животиња и етика требало да имају више простора у наставном плану и програму. Последње питање у трећем делу било је да ли студенти сматрају да област о добробити животиња треба да буде заступљенија и да ли би животиње требало да буду више заштићене и да имају већа права. Од три понуђена одговора, њих 51 (70%) је сматрало да треба, 4 да већ имају довољно права, а 45 испитаника је одговорило да није упознато са правима животиња.

Последње питање је било да ли на животињу гледају као на субјекат или објекат. Само 4% студента је сматрало да су животиње објекти, а 96% испитаних да су субјекти.

СТУДЕНТИ ШЕСТЕ ГОДИНЕ

Демографски подаци

Од укупно 100 испитаних студената завршне године студија било је 42% мушкарца и 58% жена. Сви студенти су похађали 11. семестар. Из градског подручја било је 61% испитаника, а из сеоског 39%. За професионално

интересовање, већина оцењених студената одабрала је рад са кућним љубимцима и то 36% анкетираних студената. Фармске животиње су биле први избор за 20% студената, 8% студената је изабрало инспекцијски рад, нико није желео да ради у научноистраживачкој области, а 9% студената је желело да ради у области хигијене намирница анималног порекла. Остали студенти (27%) још увек нису знали чиме ће се бавити након дипломирања. На основу статистичке анализе уочено је да постоји статистичка значајност између избора области ветеринарске делатности код студената прве и студената завршне године студија ($p < 0,0053^{**}$).

Етичке дилеме у вези са правима животиња и еутаназије

Од укупно 100 студената на питање да ли мисле да ветеринари и студенти ветерине имају довољно емпатије према животињама мишљење је подељено. Скоро половина испитаних студената (47%) је мишљења да у ветеринарској професији нема емпатије према животињама, а 53% студента је мислило другачије. Статистичком анализом уочено је да постоји статистичка значајност ($p < 0,0052^{**}$) у мишљењу студената прве и завршне године када је у питању емпатија студената према животињама.

На питање о еутаназији, студентима су постављена два питања. Прва је била етичка дилема: да ли ће еутаназирати здраву животињу само на захтев власника. На ово питање, да не би еутаназирао здраву животињу одговорио је 61% студент, а 39% студената би спровело еутаназију само на захтев власника. Друго питање које се тиче еутаназије било је да ли ће еутаназирати животињу која показује знаке агресивног понашања. Укупно 64% испитаних студената би еутаназирало агресивну животињу, а 36% не би. За друго постављено питање у вези еутаназије здраве, а агресивне животиње уочено је да постоји статистичка значајност ($p < 0,0045^{**}$) у мишљењу студената различитих година студија.

Трећи сет питања односио се на права животиња. На питање да ли треба више да брину о животињама или власнику током доношења одлука, 79% ученика је рекло да би прво били забринути за животиње, а 21% студената би предност дали власнику. На друго питање у трећем сету студентима је постављено питање о наставном плану и програму на факултету и да ли је довољно времена посвећено етици и добробити животиња. Укупно 41% испитаних студената сматра да је посвећено довољно времена, а 59% сматра да би добробит животиња и етика требало да буду заступљени у настави са већим бројем часова. Последње питање у трећем делу било је да ли студенти

сматрају да добробит животиња треба да буде више заступљена и да ли би животиње требало да буду више заштићене, као и да имају већа права. У овом питању студенти су могли да заокруже један од три одговора, тако да је 70% студената сматрало да би требало да имају већа права, 15% да већ имају довољно права, а преосталих 15% је одговорило да не познаје довољно права животиња.

Последње питање је било да ли мисле да на животињу гледају као на субјекат или објекат. Само 17% студената је сматрало да су животиње објекти, а 83% испитаних сматрало је да су животиње субјекти.

ДИСКУСИЈА

Анализом добијених података уочено је да није постојала статистичка значајност између односа полова и места где су студенти одрасли. Тренд који је присутан у америчким, аустралијским и већини европских земаља где више студената женског пола уписује ветеринарски факултет присутан је и у нашем истраживању (Lofstedt, 2003; Tomlin и сар., 2010; Porritt, 2013). Постоје различити разлози за овај тренд, као што су елиминација дискриминације на основу пола, све чешће коришћење седације за дијагностичке процедуре код великих животиња, као и слика ветеринара која се приказује на телевизији (Slater and Slater, 2000; Smith, 2002). Такође, студенти из урбаних средина више желе да раде као ветеринари, у поређењу са студентима из руралних средина. Разлог је највероватније чињеница да све мање људи жели да остане на селу и да се бави пољопривредом и сточарством. Ови резултати су у корелацији са тренутном демографском ситуацијом у нашој земљи, али и у многим земљама широм света, јер су се појавиле одговарајуће замене за животињске производе које могу да задовоље потребе човека за хранљивим материјама и здравим животом.

Ове промене очигледно утичу на одлуке студената о томе шта ће радити након дипломирања. Између интересовања студената прве и завршне године постоји статистичка значајност ($p < 0,0053^{**}$). Скоро половина студената прве године (49%) жели да ради са социјалним животињама, а само 11% са фармским животињама. Када је реч о студентима завршне године студија, већина такође жели да ради са социјалним животињама (36%), али су студенти и даље заинтересовани за рад са фармским животињама (20%). Студија Heath (2005) спроведена на студентима прве године је у корелацији са нашим подацима, где је такође 49% студената желело да ради са кућним љубимцима. Међутим, наша студија није у потпуности у корелацији са другим студијама, као што је

студија Tomlin и сар. (2010) где је само 5% испитаних студената желело да ради са фармским животињама, као и са истраживањем Serpell (2005) где је само 28% студената желело да ради са социјалним животињама. Важно је истаћи чињеницу да током студирања студенти више уче о хигијени намирница и инспекцијском раду, на завршним годинама студија. Студенти прве године студија о томе не знају довољно чиме могу да се објасне и резултати у коме је само пет студената желело да ради у овим областима ветеринарске делатности. Аутори сматрају неочекиваним резултатом да скоро исти број студената прве и завршне године студија (31% и 27%) не зна чиме жели да се бави након дипломирања. Овај резултат је очекиван за студенте прве године, али не и за студенте завршне године. Природа овог проблема може да буде различита, али даје простора за размишљање о преиспитивању наставног плана и програма. Када је у питању доношење одлука и спровођење еутаназije, већина испитаника прве године студија сматра да ветеринар треба да стави на прво место интересе животиња. Такође, сличне одговоре су дали и на питање да ли би еутаназирали животињу само ако би власник то од њих затражио. Већина је одговорила да не би (67% у првој години и 61% у завршној години). Интересантна је чињеница да би 33% из прве године и 39% из завршне године студија еутаназирало животиње на захтев власника. Студија Paul и Podberscek (2000) је показала да студенти у првим годинама студија имају већи ниво емпатије према животињама, тако да смо у нашој студији очекивали да ће мањи проценат студената прве године размишљати о еутаназiji само уколико затражи власник. Овај проценат је веома висок, посебно код студената завршне године, с обзиром на чињеницу да су одслушали предмете који се односе на права животиња и етику у ветеринарској медицини. Такође је занимљиво да би 33% студената прве године еутаназирало животиње на захтев власника, иако већина њих (73%) сматра да ветеринари и студенти ветеринарске медицине имају довољно емпатије према животињама. У овом питању постоји статистичка значајност ($p < 0,0053$) између студената прве и завршне године, јер мањи број студената завршне године студија сматра да постоји довољно емпатије за животиње у ветеринарској пракси.

Уочена је и статистичка значајност када су у питању права животиња. Већина студената завршне године студија сматра да животиње треба да имају већа права, а 15% није довољно упознато са правима животиња. Иако је већина студената прве године (51%) такође одговорила да животиње треба да имају већа права, 45% је одговорило да нису довољно упознати са њиховим правима. Ови резултати су очекивани, јер студенти више уче о правима животиња у каснијим годинама студија.

Пол испитаних студената је такође био важан када је у питању брига за права животиња, што је у корелацији са другим студијама (de Boo и Knight, 2005; Izmirli и сар., 2014). Постоји статистички значајна разлика између професионалних интересовања када су у питању мушкарци и жене. Већина жена жели да ради са кућним љубимцима, а већина мушкараца са фармским животињама, што је у корелацији са актуелним трендом у ветеринарској пракси (Smith, 2002; Goetz и сар., 2020). Постоји и статистички значајна разлика у погледу еутаназије животиња које показују знаке агресивног понашања. Жене би ређе еутаназирале здраву, агресивну животињу у поређењу са мушкарцима. Имајући у виду да су жене више забринуте по питању начина третирања животиња, овај резултат је у корелацији са претходним подацима (Cornish и сар., 2016). Већи ниво статистичке значајности уочен је код питања права животиња. Само једна студенткиња на првој и пет студената на завршној години одговорило је да животиње не би требало да имају већа права.

ЗАКЉУЧАК

Многи фактори могу да утичу на одлуке и мишљења студената о правима животињама. Резултати су указали на њихову смањену заинтересованост за бављење праксом фармских животиња, тако да на овом пољу треба радити и подстицати их како би се повећала заинтересованост за ову област ветеринарске медицине. Од значаја је и да се преиспита наставни план и програм, јер многи студенти на завршној години студија још увек не знају у којој области ветеринарске делатности желе да раде. Ова студија је од значаја и у циљу побољшања стандарда неге и добробити животиња, међу студентима ветеринарске медицине.

Захвалница

Студију је подржало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор бр. 451-03-47/2023-01/200143).

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

ЛИТЕРАТУРА

Cornish A. R., Caspar G. L., Collins T., Degeling C., Fawcett A., Fisher A. D., Freire R., Hazel S. J., Hood J., Johnson A. J., Lloyd J. (2016): Career preferences and opinions on animal welfare and ethics: a survey of veterinary students in Australia and New Zealand. *Journal of veterinary medical education*, 43(3):310-320.

- de Boo J., Knight A. (2005): Concepts in animal welfare: a syllabus in animal welfare science and ethics for veterinary schools. *Journal of veterinary medical education*, 32(4):451-453.
- Goetz M. L., Jones-Bitton A., Hewson J., Khosa D., Pearl D., Bakker D. J., Lyons S. T., Conlon, P. D. (2020): An examination of myers-briggs type indicator personality, gender, and career interests of ontario veterinary college students. *Journal of veterinary medical education*, 47(4):430-444.
- Hazel S. J., Signal T. D., Taylor N. (2011): Can teaching veterinary and animal-science students about animal welfare affect their attitude toward animals and human-related empathy? *Journal of veterinary medical education*, 38(1):74-83.
- Heath T. J. (2005): Recent veterinary graduates over the last five decades: the first 10 years. *Australian veterinary journal*, 83(12):746-750.
- Izmirli S., Yigit A., Phillips C. J. C. (2014): Attitudes of Australian and Turkish students of veterinary medicine toward nonhuman animals and their careers. *Society & Animals*, 22(6):580-601.
- Levine E. D., Mills D. S., Houpt K. A. (2005): Attitudes of veterinary students at one US college toward factors relating to farm animal welfare. *Journal of Veterinary Medical Education*, 32(4):481-490.
- Lofstedt J. (2003): Gender and veterinary medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(7):533.
- Paul E. S., Podberscek A. L. (2000): Veterinary education and students' attitudes towards animal welfare. *Veterinary Record*, 146(10):269-272.
- Porritt D. (2013): Australian veterinary workforce review report. Australian Veterinary Association Ltd.
- Serpell J. A. (2005): Factors influencing veterinary students' career choices and attitudes to animals. *Journal of veterinary medical education*, 32(4):491-496.
- Slater M. R., Slater M. (2000): Women in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217:472-476.
- Smith C. A. (2002): Gender and work: what veterinarians can learn from research about women, men, and work. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220:1304-1311.
- Tomlin J. L., Brodbelt D. C., May S. A. (2010): Veterinary students' understanding of a career in practice. *Veterinary record*, 166(25):781-786.

Рад примљен: 28.05.2023.

Рад прихваћен: 23.08.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301050D

UDK 636.066:591.5:378.4.01

Original Scientific Paper**OPINION OF FIRST AND FINAL YEAR VETERINARY STUDENTS ON
THE RIGHTS AND WELFARE OF ANIMALS****Dajana DAVITKOV, Branislav VEJNOVIĆ, Višnja JOVANOVIĆ, Darko
DAVITKOV, Sofija ŠOLAJA, Jelena Aleksić RADOJKOVIĆ***

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

*Corresponding author: Jelena Aleksić Radojković, alexjellena@vet.bg.ac.rs

Summary

Nowadays, the role of animals in society has changed. Animals are no longer considered as property, but as living beings. When it comes to veterinary medicine, there are also changes in interests between men and women, as well as professional preferences. Studies have shown that gender and concern for animal welfare also influence the level of concern for animal health. The aim of this study was to assess the difference in opinion between first and final year veterinary students in relation to ethical dilemmas and animal welfare. A total of 200 first and final year veterinary students were included in the study. *Survey Monkey* was used to collect information, and the survey consisted of ten questions. The results are divided into demographic data, ethical dilemmas in the field of animal rights and opinion on euthanasia. No statistically significant difference was found between the genders and the place of growing up of the examined students. Almost half of the first year students (49%) expressed a desire to work with social animals, and only 11% with farm animals. When it comes to final year students, most of them also want to work with social animals (36%), but there is also an interest in working with farm animals (20%). Differences in opinion about animal rights and euthanasia were more influenced by the gender of the students compared to the year of study. The study showed that, in the student population, there is a reduced interest in farm animals, and that fact should be given more attention. Also, it is necessary to guide students more towards their areas of interest during their studies, so that, when get their diploma, they can immediately know in which area of veterinary medicine they want to work.

Key words: survey, animal welfare, animal rights, students.

INTRODUCTION

Throughout history, the role of animals in people's lives has changed. Today, more importance is related to the ethical issues and problems of farm, reproductive and laboratory animals. The decision to study veterinary medicine is often made at a young age because of a love for animals (Serpell, 2005). Today, the veterinary profession is no longer dominated by men. For example, in Australia, 80% of graduate students are women (Porritt, 2013). Changing gender relations in veterinary medicine caused changes in career preferences (Lofstedt, 2003).

Data from the literature indicate that in the first years of study, students show greater concern for the welfare and health of animals (Paul and Podberscek, 2000). Also, an American study on pain in animals showed that first-year students would rather treat animals for pain compared to students in higher years of study. An interesting finding is that the view on animal welfare can be changed by attending courses on animal welfare, as proved by Hazel et al. (2011).

Studies have shown that gender and concern for animal welfare also influence the level of empathy towards animal health (Cornish et al., 2016). A high level of empathy towards animals was more present in women compared to men (Izmirli et al., 2014). Changes in gender relations are not the only element that indicates different views on ethical dilemmas among students, but professional interests were also an important part of many studies. Students who want to work with farm animals show less empathy compared to students who want to work with social animals (Levine et al., 2005). In recent years, people's awareness of the importance of the health, protection and well-being of animals has increased, and the role of veterinary medicine students is significant, because they will find themselves in everyday ethical dilemmas regarding animals and their keepers or owners.

The aim of this study was to investigate the difference between first-year and final year veterinary students in their views on ethical dilemmas such as euthanasia and to examine whether there are differences in demographics, career and degree of study that would influence their attitudes about welfare and animal rights.

MATERIALS AND METHODS

The survey was conducted on 200 students (100 first year students and 100 final year students) of the Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade. The questionnaire was designed to explore professional interests, students' opinions on euthanasia and animal rights. The survey was made using *Survey monkey* and was available online in the period from November 1 to December 1, 2021. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade (No. 1/21).

All students in the final year of studies have already attended the courses Behavior, welfare and protection of animals and Ethics and communication in veterinary medicine, while students in the first year have only attended the course Behavior, welfare and protection of animals. Anonymity was guaranteed for all participants. The questionnaire consisted of ten questions. The first two questions were demographic questions (gender and place of residence), and the third question was related to professional interests. The next seven questions were ethical dilemmas about animal rights and euthanasia. All data were checked for errors and statistical analysis was performed using *GenStat* software.

RESULTS

FIRST YEAR STUDENTS

Demographic data

Out of a total of 100 first year students, 33% were men and 67% were women. All students were in the first semester of their studies. 70% of the students were from the urban area, and 30% from the rural area. For professional interest, the majority of surveyed students chose working with pets (49%). Farm animals were the first choice for 11% of students, 4% of students chose inspection work, 4% wanted to engage in scientific work, one wanted to work in the field of animal food hygiene, and 31% of students were undecided.

Ethical dilemmas regarding animal rights and euthanasia

When 100 first year students were asked if they think that veterinarians and veterinary students have enough empathy for animals, the opinion was divided. The majority (73%) believe that there is empathy towards animals in the veterinary profession, and 27% believe that there is not enough empathy towards animals in the veterinary profession.

Students were asked two questions related to their opinion on euthanasia. First, there was an ethical dilemma: whether to euthanize a healthy animal only at the owner's request. To this question, 67% of students answered that they would not euthanize a healthy animal, and 33% would perform euthanasia. Another question was whether they would euthanize an animal that exhibited aggressive behavior. A total of 43% of respondents would euthanize an aggressive animal, and 57% would not decide on euthanasia, even though the animal is aggressive.

The third set of questions was about animal rights. When asked whether they should care more about the animals or the owner when making decisions, 72% of students said that they would primarily care for the animal, and 28% would primarily respect

the owner's wishes. On the second question in the third set, students were asked whether the curriculum devotes enough time to animal ethics and welfare. A total of 40 (41%) respondents believed that enough time was devoted to these subjects, and 59 (59%) believed that animal welfare and ethics should have more space in the curriculum. The last question in the third part was whether the students think that the field of animal welfare should be more represented and whether animals should be more protected and have greater rights. Of the three answers offered, 51 of them (70%) believed that they should, 4 that they already had enough rights, and 45 respondents answered that they were not familiar with animal rights. The last question was whether they observe the animal as a subject or an object. Only 4% of the students respond that animals are objects, and 96% respond that animals are subjects.

SIXTH YEAR STUDENTS

Demographic data

Out of a total of 100 surveyed final year students, 42% were men and 58% were women. All students attended the 11th semester. 61% of respondents were from urban areas, and 39% from rural areas. For professional interest, the majority of evaluated students chose to work with pets, namely 36% of surveyed students. Farm animals were the first choice for 20% of students, 8% of students chose inspection work, no one wanted to work in the scientific field, and 9% of students wanted to work in the area of food hygiene of animal origin. Other students (27%) still did not know what they would do after graduation. Based on the statistical analysis, it was observed that there is a statistical significance between the choice of the field of veterinary activity among first and final year students ($p < 0.0053^{**}$).

Ethical dilemmas regarding animal rights and euthanasia

When 100 students were asked if they think that veterinarians and veterinary students have enough empathy for animals, the opinion was divided. Almost half of the surveyed students (47%) have the opinion that there is no empathy for animals in the veterinary profession, and 53% of students thought otherwise. Statistical analysis showed that there is statistical significance ($p < 0.0052^{**}$) in the opinion of first and final year students when it comes to students' empathy towards animals. When asked about euthanasia, students were asked two questions. The first was an ethical dilemma: whether to euthanize a healthy animal on the owner's request. To this question, 61% of students answered that they would not euthanize a healthy animal, and 39% of students would perform euthanasia only at the owner's request.

Another question regarding euthanasia was whether to euthanize an animal that shows signs of aggressive behavior. A total of 64% of the surveyed students would euthanize an aggressive animal, and 36% would not. For the second question regarding the euthanasia of a healthy but aggressive animal, it was observed that there is statistical significance ($p < 0.0045^{**}$) in the opinion of students of different years of study.

The third set of questions was about animal rights. When asked whether they should worry more about the animals or the owner when making decisions, 79% of the students said that they would be concerned about the animals first, and 21% of the students would give priority to the owner. On the second question in the third set, students were asked about the curriculum at the Faculty and whether enough time is devoted to ethics and animal welfare. A total of 41% of surveyed students believe that enough time is devoted, and 59% believe that animal welfare and ethics should be represented in classes with a larger number of classes. The last question in the third part was whether the students think that the welfare of animals should be more represented and whether animals should be more protected, as well as have greater rights. In this question, students could give one of three answers, and 70% of students thought they should have more rights, 15% that they already have enough rights, and the remaining 15% answered that they do not know enough about animal rights.

The last question was whether they observe the animal as a subject or an object. Only 17% of students answered that animals are objects, and 83% of respondents answered that animals are subjects.

DISCUSSION

Analyzing the obtained data, it was observed that there was no statistical significance between the gender relationship and the place where the students grew up. The trend that is present in the American, Australian and most European countries, where more female students are enrolled in the veterinary faculties, is also present in our study (Lofstedt, 2003; Tomlin et al., 2010; Porritt, 2013). There are various reasons for this trend, such as the elimination of gender discrimination, the increasing use of sedation for diagnostic procedures in large animals, and the presentation of veterinarians in the media (Slater and Slater, 2000; Smith, 2002). Also, students from urban areas prefer to work as veterinarians, compared to students from rural areas. The reason is most likely the fact that less people want to stay in the rural areas and engage in agriculture and animal husbandry. These results are correlated with the current demographic situation in our country, but also in many countries

around the world, because suitable substitutes for animal products have appeared that can satisfy human needs for nutrients and a healthy life.

These changes obviously affect students' decisions about what they will do after graduation. There is statistical significance between the interest of first and final year students ($p < 0.0053^{**}$). Almost half of first year students (49%) want to work with social animals, and only 11% with farm animals. When it comes to final year students, the majority also want to work with social animals (36%), but students are still interested in working with farm animals (20%). The study published in Heath (2005) conducted on first year students correlates with our data, where also 49% of students wanted to work with pets. However, our study does not fully correlate with other studies, such as the study by Tomlin et al. (2010) where only 5% of the surveyed students wanted to work with farm animals, as well as with the study done by Serpell (2005) where only 28% of students wanted to work with social animals. It is important to highlight the fact that during their studies, students learn more about food hygiene and inspection work, in the final years of their studies. First year students do not know enough about this fields, and that can explain the results in which only five students wanted to work in these areas of veterinary medicine. The authors consider an unexpected result that almost the same number of first and final year students (31% and 27%) do not know what they want to do after graduation. This result is expected for first year students, but not for final year students. The nature of this problem may be different, but it gives space for reviewing the curriculum.

When it comes to making decisions and carrying out euthanasia, the majority of respondents in the first year of study believe that the veterinarian should put the interests of the animals first. They also gave similar answers to the question of whether they would euthanize an animal only if the owner asked them to do so. The majority answered that they would not (67% in the first year and 61% in the final year). It is an interesting that 33% from the first year and 39% from the final year of studies would euthanize animals at the owner's request. The study by Paul and Podberscek (2000) showed that students in the first years of their studies have a higher level of empathy towards animals, so in our study we expected that a smaller percentage of first year students would obtain euthanasia only if the owner requested it. This percentage is very high, especially among students in their final year, given the fact that they have taken courses related to animal rights and ethics in veterinary medicine. It is also interesting that 33% of first year students would euthanize animals at the owner's request, although most of them (73%) believe that veterinarians and students of veterinary medicine have enough empathy for animals. In this question, there is statistical significance ($p < 0.0053$) between first

and final year students, because a smaller number of final year students believe that there is enough empathy for animals in veterinary practice.

Statistical significance was also observed when it comes to animal rights. The majority of final year students believe that animals should have greater rights, and 15% are not sufficiently familiar with animal rights. Although the majority of first year students (51%) also answered that animals should have more rights, 45% answered that they are not sufficiently familiar with their rights. These results are expected, as students learn more about animal rights in their later years of study.

The gender of the surveyed students was also important when it comes to concern for animal rights, which correlates with other studies (de Boo and Knight, 2005; Izmirli et al., 2014). There is a statistically significant difference between the professional interests of men and women. Most women want to work with pets, and most men want to work with farm animals, which correlates with the current trend in veterinary practice (Smith, 2002; Goetz et al., 2020). There is also a statistically significant difference in the euthanasia of animals showing signs of aggressive behavior. Women are less likely to euthanize a healthy, aggressive animal compared to men. Considering that women are more concerned about the way animals are treated, this result correlates with previous data (Cornish et al., 2016). A higher level of statistical significance was observed in the issue of animal rights. Only one student in the first year and five students in the final year answered that animals should not have more rights.

CONCLUSION

Many factors can influence students' decisions and opinions about animal rights. The results indicated their reduced interest in dealing with the farm animals, so it is necessary to encourage them in order to increase interest in this field of veterinary medicine. It is also important to review the curriculum, because many students in their final year of study still do not know in which field of veterinary medicine they want to work. This study is also important in order to improve the standards of animal care and welfare among students of veterinary medicine.

Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract No. 451-03-47/2023-01/200143).

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

REFERENCES

- Cornish A. R., Caspar G. L., Collins T., Degeling C., Fawcett A., Fisher A. D., Freire R., Hazel S. J., Hood J., Johnson A. J., Lloyd J. (2016): Career preferences and opinions on animal welfare and ethics: a survey of veterinary students in Australia and New Zealand. *Journal of veterinary medical education*, 43(3):310-320.
- de Boo J., Knight A. (2005): Concepts in animal welfare: a syllabus in animal welfare science and ethics for veterinary schools. *Journal of veterinary medical education*, 32(4):451-453.
- Goetz M. L., Jones-Bitton A., Hewson J., Khosa D., Pearl D., Bakker D. J., Lyons S. T., Conlon, P. D. (2020): An examination of myers-briggs type indicator personality, gender, and career interests of ontario veterinary college students. *Journal of veterinary medical education*, 47(4):430-444.
- Hazel S. J., Signal T. D., Taylor N. (2011): Can teaching veterinary and animal-science students about animal welfare affect their attitude toward animals and human-related empathy? *Journal of veterinary medical education*, 38(1):74-83.
- Heath T. J. (2005): Recent veterinary graduates over the last five decades: the first 10 years. *Australian veterinary journal*, 83(12):746-750.
- Izmirli S., Yigit A., Phillips C. J. C. (2014): Attitudes of Australian and Turkish students of veterinary medicine toward nonhuman animals and their careers. *Society & Animals*, 22(6):580-601.
- Levine E. D., Mills D. S., Houpt K. A. (2005): Attitudes of veterinary students at one US college toward factors relating to farm animal welfare. *Journal of Veterinary Medical Education*, 32(4):481-490.
- Lofstedt J. (2003): Gender and veterinary medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(7):533.
- Paul E. S., Podberscek A. L. (2000): Veterinary education and students' attitudes towards animal welfare. *Veterinary Record*, 146(10):269-272.
- Porritt D. (2013): Australian veterinary workforce review report. Australian Veterinary Association Ltd.
- Serpell J. A. (2005): Factors influencing veterinary students' career choices and attitudes to animals. *Journal of veterinary medical education*, 32(4):491-496.
- Slater M. R., Slater M. (2000): Women in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217:472-476.
- Smith C. A. (2002): Gender and work: what veterinarians can learn from research about women, men, and work. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220:1304-1311.
-

Tomlin J. L., Brodbelt D. C., May S. A. (2010): Veterinary students' understanding of a career in practice. *Veterinary record*, 166(25):781-786.

Paper received: 28.05.2023.

Paper accepted: 23.08.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301059H

UDK 636.2:618.19-002

Originalni naučni rad

OSJETLJIVOST BAKTERIJSKIH SOJEVA IZOLOVANIH U SLUČAJEVIMA MASTITISA KRAVA NA ANTIBIOTIKE I ETERIČNA ULJA

Sajma HUREMOVIĆ*

Javna Ustanova Veterinarski zavod Tuzlanskog kantona, Tuzla, Bosna i Hercegovina

*Korespondentni autor: Sajma Huremović, sajma.huremovic@vetzavodtk.ba

Sažetak

Mastitis je upalna reakcija vimena koju uzrokuju mikroorganizmi odnosno hemijske ili mehaničke povrede. Bakterijske mastitise uzrokuje nekoliko vrsta bakterija, koji se dijele u dvije glavne grupe: kontagiozni mastitisi uzrokovani sa *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis* i mastitisi uzrokovani ubikvitarnim bakterijama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ili *Proteus spp.* Trenutno se umjesto upotrebe antibiotika traže nove strategije za smanjenje ovog kliničkog zdravstvenog problema. Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa na antibiotike i eterična ulja origana (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) i timijana (*Thymus serpyllum*). Tokom ispitivanja korišteni su uzorci sekreta vimena muznih krava sa područja Kalesije i Gradačca, dobiveni mašinskim i ručnim načinom. Ispitano je ukupno 200 uzoraka mliječnih krava u različitim periodima laktacije i starosti. Kontrola mastitisa obuhvatala je određivanje broja somatskih stanica u mlijeku Kalifornija mastitis testom, odnosno brojanje somatskih stanica na Fossomatik aparatu, nakon čega su svi uzorci sa povećanim brojem somatskih stanica mikrobiološki ispitani. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se zaključiti da postoje opravdani razlozi zbog kojih treba razmotriti upotrebu eteričnih ulja kao alternativu upotrebe antibiotika u terapiji životinja oboljelih od mastitisa.

Ključne riječi: mastitis, patogeni, antibiotici, eterična ulja.

UVOD

Mastitis je upalna reakcija tkiva vimena najčešće mikrobne etiologije. Do infekcije dolazi kada infektivni agens kroz sisni otvor prodre u mliječnu žlijezdu, počne se

umnožavati i svojim štetnim metaboličkim proizvodima oštećivati tkivo vimena. Najčešći bakterijski uzročnici mastitisa su: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus* vrste (Bannerman, 2004). Kao posljedica infekcije dolazi do izlučivanja uzročnika i njihovih toksina putem mlijeka, koje dalje predstavlja opasnost po zdravlje potrošača. U borbi protiv uzročnika mastitisa primjenjuju se različite strategije uključujući redovne kontrole zdravlja vimena, profilaktičku terapiju u periodu zasušenja, vakcinaciju kao i isključivanje iz proizvodnje oboljelih grla. Kod pojave mastitisa tokom laktacije često se primjenjuje antibiotska terapija. Dugotrajnim korišćenjem jednog antimikrobnog sredstva uništavaju se osjetljivi sojevi patogenih bakterija i vrši se selekциони pritisak koji favorizuje otporne sojeve mikroorganizma i vremenom se pojavljuje fenomen rezistencije. Bakterije ispoljavaju sve veću antimikrobnu rezistenciju što predstavlja jedan od najvećih javnozdravstvenih problema koji privlači savremenu naučnu javnost (Bačić, 2009). U antimikrobnoj terapiji mastitisa mogu se koristiti razne alternativne supstance koje se karakterišu antibakterijskim dejstvom, dovodeći do spriječavanja rasta i razmnožavanja ili uništavanja uzročnika. Kod infekcija vimena mogu se u preventivne i terapijske svrhe primjenjivati eterična ulja i/ili njihove aktivne komponente. Eterična ulja koja se mogu koristiti u terapiji mastitisa mogu poticati od biljaka kao što su: korijander (*Coriandrum sativum* L.), origano (*Origanum vulgare* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), cimet (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), žalfija (*Salvia officinalis* L.), majčina dušica (*Thymus serpyllum*) i karanfilić (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Kao aktivne komponente ovih eteričnih ulja izolovani su, između ostalih karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol. Kombinirana terapija konvencionalnih antibiotika i eteričnih ulja trenutno uzima sve veći zamah i predstavlja potencijalni prostor za buduća istraživanja.

Cilj istraživanja je utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa na neke vrste antibiotika i eterična ulja origana (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) i timijana (*Thymus serpyllum*). Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljani su sljedeći zadaci:

- izolacija i identifikacija uzročnika supkliničkih mastitisa krava primjenom konvencionalnih bakterioloških tehnika,
 - određivanje broja somatskih stanica,
 - utvrđivanje osjetljivosti izolovanih sojeva uzročnika mastitisa prema antibioticima,
-

- ispitivanje antibakterijskog efekta eteričnih ulja *Origanum compactum*, *Origanum majorana* i *Thymus serpyllum* na izolovane sojeve uzročnike mastitisa,
- utvrđivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija za eterična ulja i njihovo sinergističko djelovanje.

MATERIJALI I METODE

U istraživanju su korišteni uzorci sekreta vimena muznih krava sa područja Kalesije i Gradačca, dobijeni mašinskim načinom muže. Analizirani su uzorci mlijeka uzetih od 200 mliječnih grla (po 100 uzoraka sa svakog područja).

Izolacija i identifikacija bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa izvršena je u bakteriološkom laboratoriju Javna ustanova „Veterinarski zavod Tuzlanskog kantona“, a ispitivanje osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike i eterična ulja u mikrobiološkom laboratoriju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Tuzli.

Uzorci mlijeka za mikrobiološka ispitivanja uzeti su aseptično, prije redovne muže. Najprije je vime oprano mlakom vodom i sapunicom, naročito papile, i obrisano čistom krpom. Dezinfekcija vrhova papila je vršena vatom natopljenom 70% etanolom, principom „k sebi“. Prvo su dezinfikovane dalje četvrti, pa onda bliže da bi se izbegla kontaminacija već dezinfikovanih papila. Iz svake četvrti vimena istisnuta su tri mlaza mlijeka, prije nego što se pristupilo uzorkovanju. Nakon dezinfekcije, izvršeno je izmuzanje svake četvrti posebno u sterilne plastične bočice zapremine 50 ml (Slika 1). Nakon uzorkovanja, uzorci mlijeka su stavljani u ručni frižider (temperatura 4°C) i transportovani u laboratoriju na bakteriološki pregled.



Slika 1 Uzorci sekreta vimena iz oboljelih četvrti za bakteriološku analizu

Kontrola mastitisa obuhvatala je određivanje broja somatskih stanica u mlijeku Kalifornija mastitis testom (KMT) (White i sur., 2005), a zatim brojanje somatskih stanica na Fossomatik aparatu, nakon čega su svi uzročnici sa povećanim brojem somatskih stanica mikrobiološki ispitani.

Broj somatskih stanica (BSS) pokazatelj je higijenske kvalitete mlijeka i opći je indikator zdravstvenog stanja vimena. BSS direktno pokazuje stanje zdravlja mliječne žlijezde. Somatske stanice u mlijeku su porijeklom iz vimena i krvi, a najčešće su to leukociti. Za kravlje mlijeko utvrđena je gornja granica od 400.000 somatskih stanica (SS)/ml, iznad koje dolazi do pojave supkliničkog mastitisa. U mlijeku zdravih četvrti, broj somatskih stanica je manji od 200.000 u ml, a čine ih epitelne stanice i leukociti (polimorfonuklearni neutrofili, limfociti, makrofagi). Uredbom o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka (Propis, 1994) definisano je da prerađivači mlijeka mogu otkupljivati samo mlijeko koje zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011) i proračunom geometrijske sredine. Uzorci sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml se stavljaju van klase. Za izolaciju *S. aureus* iz uzoraka sekreta vimena krava služi krvni agar, jer omogućava porast najučestalijih bakterijskih uzročnika u aerobnim uvjetima inkubiranja. Za rutinsko zasijavanje sekreta vimena na krvni agar koriste se jednokratne plastične eze volumena 0.01 ml. Za veće volumene mogu se koristiti štapići za obriske ili pipete. Zasijane podloge inkubiraju se 24 do 48 sati pri 37°C u obrnutom položaju. Nakon inkubacije od 24 sata na krvnom agaru porastu kolonije koje su okrugle, glatke, sjajne površine, ravnih ivica, blago konveksne, pigmentisane, bijele ili krem boje, ponekad žute pa i narandžaste, promjera 1-2 mm i mogu pokazivati hemolizu. Ako nema poraslih kolonija, inkubacija zasijanog uzoraka produžava se još 24 sata. Na mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu, sa kulture porasle na krvnom agaru, vidljive su Gram pozitivne koke karakterističnog rasporeda u vidu grozdova. Karakteristične beta hemolitične kolonije sa krvnog agara precjepljuju se na selektivnu podlogu Baird-Parker agar (BPA) na kojima stafilokoke stvaraju kolonije koje su crne, konveksne i sjajne, promjera 1-1,5 mm. Bakterije iz roda *Staphylococcus* produciraju enzim katalazu, odnosno katalaza su pozitivni. Dokazivanje produkcije ovog enzima vrši se s 3-5% H₂O₂. Vrste roda *Staphylococcus* se diferenciraju prema sposobnosti da koagulišu plazmu pomoću enzima koagulaze. *S. aureus* je koagulaza pozitivan, dok su druge vrste roda *Staphylococcus* koagulaza negativne. Vezana koagulaza se određuje testom na pločici, a slobodna koagulaza testom u epruveti. Kao pozitivna i negativna kontrola korišteni su certificirani referentni sojevi (pozitivna kontrola *Staphylococcus aureus* WDCM 00034, negativna kontrola *Staphylococcus epidermidis* WDCM 00036). Pozitivan rezultat je vidljivo stvaranje grudvica unutar 10 sekundi, a kod

negativnog rezultata nema vidljivog stvaranja grudvica. Izolacija i identifikacija *Streptococcus* i *Streptococcus agalactiae* rađena je na način da se uzorak sekreta vimena inkubira na krvnoj podlozi 24 sata na 37°C, a nakon inkubacije na pločama je vidljiv porast karakterističnih kolonija. Kolonije su sitne, sivkaste ili prozračne, konveksne i kompaktne (potpune, cjelovite, zaokružene). Neki sojevi zahtijevaju za rast prisustvo ugljen dioksida. Na krvnom agaru streptokoki pokazuju hemolizu. Kolonije *Enterococcus* spp. mogu imati zonu α hemolize ili biti bez hemolize, sivkaste su, sjajne i nisu kompaktne. Kolonije koje morfološki odgovaraju streptokokima se precjepljuju na selektivnu podlogu eskulin azid agar i inkubiraju 24 sata na 37°C. Na mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu sa kulture porasle na krvnom agaru pronađeni su Gram pozitivni koki, okrugli ili ovoidni, dijametra 0,6-1 μ m, raspoređeni u parovima i lancima različite dužine. Za dokazivanje *Str. agalactiae* se koristi CAMP test. Ovim testom se otkriva prisustvo CAMP faktora (Christie, Atkins and Munch Peterson) – ekstracelularni proteina koji pojačava beta hemolizu *S. aureus*. Pozitivan je kod *Str. agalactiae*. Test se izvodi povlačenjem stafilocokne kulture uzduž krvnog agara sa 10% ovčije krvi, a zatim okomito na nju zasijava se ispitivani soj streptokoka u vidu crte počevši od kraja ploče do blizu stafilocokne crte. Za izvođenje ovog testa potreban je soj *S. aureus* sa dvostrukom zonom hemolize. Nakon inkubacije na 35-37°C tokom 24 sata posmatra se da li je u blizini stafilocokne crte došlo do kopljastog pojačanja hemolize streptokoka (Maksimović i Rifatbegović, 2015). Dalja identifikacija zasnivala se na analizi potvrdnog testa za prisustvo intestinalnih enterokoka razgradnjom eskulina. Jedna tipična kolonija se subkultivirala na žuč eskulin agar i inkubirala na 44°C tokom 48 sata. Identifikacija izolata do nivoa vrste zasnivala se na bojenjem preparata po Gramu, negativnom testu katalaze i biohemijskom testu razgradnje šećera (sorbitola i arabinoze). Sterilnom ezom jedna kolonija prenesena je u epruvete u kojima su se nalazili navedeni šećeri, a potom su epruvete stavljane na inkubaciju preko noći na temperaturi od 37°C. Pozitivna reakcija se očitavala u vidu promjene boje šećera iz ružičaste u crvenu, uz uočljivo zamućenje, što je glavni identifikacioni faktor kojim je moguće razlikovati dvije vrste, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. *Enterococcus faecalis* ima mogućnost razgradnje sorbitola, ali ne razgrađuje arabinozu, dok *Enterococcus faecium* razgrađuje arabinozu, ali ne razgrađuje sorbitol. Izolacija i identifikacija *E. coli* iz uzoraka sekreta vimena također je izvođena na način da se uzorak zasijava i inkubira na krvnoj podlozi 24 sata na 37°C, a nakon inkubacije na pločama je porast velikih, glatkih, sjajnih i okruglih kolonija. Karakteristične kolonije se presijavaju na MacConkey agar. Na MacConkey agaru kolonije mijenjaju boju u ružičastu uslijed fermentacije laktoze. Identifikacijom mikroskopskim preparatom bojenim po

Gramu vidljive su Gram negativne bakterije oblika pravih štapića, raspoređene pojedinačno ili u parovima. Za dalju identifikaciju korišten je API 20 E test (BioMérieux, 2002) koji je standardizirani sistem identifikacije *Enterobacteriaceae* i drugih Gram negativnih bakterija. API 20 E traka sastoji se od 20 mikro epruveta koje sadrže dehidrirane supstrate. Ovi testovi su inokulirani bakterijskom suspenzijom koja rekonstituira medij. Tokom inkubacije dolazi do promjene u boji koje se otkrivaju spontano ili dodatkom reagensa. Reakcije se iščitavaju u skladu s priloženom tabelom, a identifikacija se vrši pozivanjem na Analitički indeks profila ili pomoću softvera za identifikaciju. Test oksidaze se mora izvesti u skladu s uputama proizvođača. Rezultat treba zabilježiti na rezultatskom listu jer je to sastavni dio završnog profila (Schuster, 1997). Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike i eterična ulja vršeno je na tri bakterijska izolata, a koristila se Disk difuziona metoda prema CLSI M02-A11 standardu (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012) uz upotrebu antibiogram diskova (Conda pronadisa, Micro & Molecular Biology, Spain): Amoxicillin/clavulanic acid 30µg, Amoxicillin 30µg, Cephalexin 30µg, Doxycycline 30µg, Enrofloxacin 10µg, Gentamicin 30µg, Lincomycin 30µg, Oxytetracycline 30µg, Penicillin 10µg, Trimethoprim/sulphamethoxazol 25µg. Interpretacija kategorija vršila se prema istom standardu (CLSI, 2014). Disk difuziona metoda zbog svoje se jednostavnosti već dugi niz godina rutinski koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Inokulum se priprema razblaživanjem 18-24-satne čiste bakterijske kulture. Ezom se pikira 4-5 kolonija i prenese u 5 ml fiziološkog rastvora. Suspenzija se vorteksira, a potom se gustina suspenzije (turbiditet) podešava poređenjem sa 0,5 McFarland standardom. Inokulum se zasijava brisom, ezom ili staklenim štapićem ravnomjerno na površinu podloge (Bauer, 1966). Poslije zasijavanja inokuluma poželjno je da podloga stoji 10-15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se površina osušila. Postavljanje diskova izvodi se dispenzerom ili sterilnom pincetom. Razmak između diskova je najmanje 3 cm, a rastojanje od ivice posude najmanje 1cm. Na ploču prečnika 10 cm nanosi se maksimalno 6 diskova. Zasijane podloge sa postavljenim diskovima antibiotika se inkubiraju na odgovarajućoj temperaturi u aerobnim, mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima, zavisno od vrste bakterija koje se ispituju, a ploče su okrenute poklopcem na gore. Budući da debljina i sastav hranjive podloge mogu uticati na rezultate, postupak se izvodi u skladu s načelima koja ujednačuju metodologiju izvođenja. Nakon inkubacije na 37°C tokom 24 sata, mjeračem sa milimetarskom podjelom se mjeri prečnik zone inhibicije rasta ispitivanog bakterijskog soja za pojedine antibiotike. Prema CLSI M02-A11 standardu, na osnovu izmjerenih vrijednosti prečnika zone inhibicije rasta, vrši se procjena stepena osjetljivosti i svrstavanje u jednu od tri kategorije: S (sensitive) – osjetljiva

- infekcija izazvana osjetljivim sojem liječi se uobičajenim (optimalnim) terapijskim dozama.; I- (intermediate) – umjereno osjetljiva - infekcija izazvana umjereno osjetljivim sojem liječi se višim terapijskim dozama antibiotika; R-(resistant) – otporna - infekcija izazvana rezistentnim sojem ne može se liječiti ispitivanim antibioticima. Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija na tri eterična ulja *Thymus serpyllum*, *Origanum majorana* i *Origanum compactum* (Fadli, 2012) korišteno je po 10 izolata koagulaza negativnih stafilokoka (KNS), *Enterococcus faecalis* i *E. coli*. Bakterije su kultivirane na Baird-Parker agar, Slanetz Bartley agar i MacConkey agaru preko noći, za dobijanje pojedinačnih kolonija. Zatim su kolonije suspendovane u 0,9% sterilnoj fiziološkoj otopini da bi se postigla zamućenost jednaka 0,5 McFarlandovom standardu (10^8 CFU/ml). Nakon toga Mueller Hinton agar je inokuliran bakterijskom suspenzijom. Na svaku ploču nanoseno je 50 μ l za svako eterično ulje u bunarčiće promjera 6mm. Ploče su inkubirane 24 sata na 35°C. Interpretacija rezultata provedena je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima. Kriteriji za procjenu antimikrobne osjetljivosti eteričnih ulja predviđaju da zona inhibicije manja od 10 mm ukazuje na neosjetljivost i otpornost bakterija na eterično ulje, 10 do 15 mm ukazuje na slabo antimikrobno djelovanje ulja, 16 do 20 mm na umjereno antimikrobno djelovanje i zona od 20 mm na naglašeno antimikrobno djelovanje. Mikrodilucioni test u bujonu (MIC) i određivanje minimalne baktericidne koncentracije antimikrobnih supstanci (MBC) vršilo se prema standardu (Lambert, 2001). MBC se izvodio nakon određivanja MIC vrijednosti, presijavanjem bakterija iz bazenčića mikrotitracione ploče na Mueller Hinton agar i to kako iz bazenčića MIC vrijednosti tako i iz bazenčića četiri naredne više koncentracije. Difuzioni test se koristio i za određivanje antimikrobnog efekta eteričnih ulja origana i timusa na bakterijske izolate (Choi i sur., 2012). Mikrodilucionom metodom se određivala minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) koja predstavlja najnižu testiranu koncentraciju eteričnog ulja na kojoj nema vidljivog rasta. Ova metoda se izvodi na mikrotitar pločama koje sadrže 96 bunarčića korištenjem MH bujona, bakterijske suspenzije i različitih koncentracija eteričnog ulja. Očitavanje minimalne inhibitorne koncentracije omogućila je upotreba indikatorske supstance 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC solucija) koja uslijed jasne promjene boje, izazvane promjenom pH vrijednosti tokom rasta kulture, olakšava očitavanje dobijenih rezultata. Sinergistički efekat između eteričnih ulja na bakterijske izolate uzročnike mastitisa krava određivao se checkerboard metodom. Ovom metodom određuje se interakcija i jačina dvije ispitivane supstance kada se koriste istovremeno, odnosno potencijalna moć dva eterična ulja kao i eteričnih ulja i antibiotika u usporedbi sa njihovim pojedinačnim učinkom. Dakle, ovom metodom određuje se interakcija i jačina dvije testne

supstance (A i B) kada se koriste istovremeno, što se izražava kao FIC vrijednost (frakcionarna inhibitorna koncentracija). Antibiotik je u ovom slučaju označen kao supstanca A, dok je eterično ulje predstavljalo supstancu B. Na osnovu prethodno određenih MIK vrijednosti, napravljene su serije standardnih razblaženja supstanci A i B u cilju ispitivanja njihove kombinovane interakcije (početne koncentracije za pripremu razblaženja su MIK vrijednosti testiranih supstanci i opadale su horizontalno u mikrotitar ploči za antibiotik, a vertikalno za eterično ulje). Nakon pripreme serijskih razblaženja antimikrobnih agenasa u mikrotitar pločama, pripremljene su i dodate bakterijske suspenzije testiranih sojeva na isti način kao i u testovima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pojedinačnih agenasa. U mikrotitar ploču sa 96 bunarčića, dodavano je određenim redoslijedom po 90 μ L inokuliranog MH bujona i 10 μ L serijskog razblaženja kombinacije supstanci A i B. Konačni volumen u svakom bunarčiću bio je 100 μ L, krajnja gustoća bakterijskih stanica je 10^6 CFU/ml. Mikrotitar ploče su inkubirane preko noći na 35 °C, a rezultati su očitavani na već opisan način uz dodatak TTC. Najmanja koncentracija agenasa u kombinaciji potrebna da spriječi pojavu crvene boje smatrana je vrijednošću MIK. Dobijene MIK vrijednosti testiranih kombinacija su korištene za određivanje FIC indeksa i interpretaciju tipa interakcije između antimikrobnih agenasa. U uzorcima mlijeka analizirali smo i ukupan broj somatskih stanica instrumentalnom metodom brojanja sa aparatom *Fossomatic* (*Fossomatic* brojanje).

REZULTATI

Prema KMT na području Kalesije identifikovano je neispravnih 41 od ukupno 100 obrađenih uzoraka (25 ih je bilo u tragovima, slabo pozitivnih je bilo 23, a umjereno pozitivnih 17, jako pozitivnih 1). Na području Kalesije nije bilo slučajeva kliničkog mastitisa. S obzirom da je KMT orijentacijski postupak kojim se neizravno može dobiti uvid u broj somatskih stanica, zanimala nas je usporedba rezultata dobivenih postupkom KMT i pomoću *Fossomatic* brojanja.

U Tabeli 1 dat je uporedni prikaz rezultata KMT testa i *Fossomatic* brojanja za područje Kalesije.

Tabela 1 Uporedni prikaz rezultata BSS KMT testa i instrumentalne metode – područje Kalesija

Procjena rezultata instrumentalna metoda	Broj uzoraka	Srednja vrijednost BSS	Procjena reakcije KMT	Broj uzoraka	Srednja vrijednost BSS
negativan (-)	47	119.124	negativno (-)	34	241.778
slabo pozitivan (+)	17	386.273	u tragovima (+/-)	25	337.561
pozitivan (++)	19	1.259.682	slabo pozitivno (+)	23	906.385
jako pozitivan (+++)	17	2.832.250	umjereno pozitivno (++)	17	1.851.941
			jako pozitivno (+++)	1	5.971.000
			klinički mastitis	0	0

Geometrijska sredina kod negativnih uzoraka prema instrumentalnoj metodi na području Kalesije iznosila je 119.124 za 47 uzoraka, dok je prema KMT ista iznosila 241.778 za 34 uzoraka.

U Tabeli 2 dat je uporedni prikaz rezultata KMT testa i *Fossomatic* brojanja za područje Gradačca.

Tabela 2 Uporedni prikaz rezultata BSS KMT testa i instrumentalne metode – područje Gradačca

Procjena rezultata instrumentalna metoda	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Procjena reakcije KMT	Broj uzoraka	Srednja vrijednost BSS
negativan (-)	49	205.846	negativno (-)	35	125.090
slabo pozitivan (+)	7	373.333	u tragovima (+/-)	19	267.231
pozitivan (++)	21	938.500	slabo pozitivno (+)	16	841.263
Jako pozitivan (+++)	23	8.422.000	umjereno pozitivno (++)	27	1.447.867
			jako pozitivno (+++)	2	6.474.000
			klinički mastitis	1	6.290.000

Geometrijska sredina (srednja vrijednost) broja somatskih stanica na području Gradačca, kod negativnih uzoraka, prema KMT iznosila je 125.090 za 35 uzoraka, dok je kod instrumentalne metode iznosila 205.846 za 49 uzoraka. U skladu s Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011) uzorci su obrađeni instrumentalnom metodom, a sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml i više stavljeni su van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa.

KNS kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 8,5% uzoraka (17/200) (Tabela 3).

Tabela 3 Tabelarni prikaz KNS izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
KNS	8		9

Enterococcus faecalis kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 5% uzoraka (10/200) (Tabela 4).

Tabela 4 Tabelarni prikaz *Enterococcus faecalis* izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
<i>Enterococcus faecalis</i>	6		4

E. coli kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 26% uzoraka (52/200) (Tabela 5).

Tabela 5 Tabelarni prikaz *E. coli* izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
<i>E. coli</i>	22		30

Iz rezultata brojanja somatskih stanica instrumentalnom metodom *Fossomatic* aparatom i izolacije uzročnika (Tabela 6) jasno se vidi da su uzorci sa povećanim BSS također i prema bakteriološkom nalazu bili neispravni, te da su bakterije razlog povećanja istih.

Tabela 6 Uporedni prikaz rezultata somatskih stanica instrumentalnom metodom i izolovanih uzročnika mastitisa

Područje Gradačca		Područje Kalesije	
% neispravnih uzoraka utvrđenih instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica	Ukupan broj izolovanih uzročnika	% neispravnih uzoraka utvrđenih instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica	Ukupan broj izolovanih uzročnika
44	43	36	36

Za ispitivanje profila osjetljivosti izolata Koagulaza negativnih stafilocoka, *Enterococcus faecalis* i *E. coli* na antibiotike analizirano je po 10 izolata od svake vrste. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 7, 8 i 9. Interpretacija rezultata provedena je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima.

Tabela 7 Osjetljivost izolata KNS na antibiotike

KNS	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
2.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
3.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
5.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S
6.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
8.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
10.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S

R – rezistencija na antibiotik; S – osjetljivost; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P– penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Svih deset izolata KNS pokazalo je osjetljivost na AMC i ENR, četiri izolata KNS bila su osjetljiva na penicillin 10µg, dok je ostalih šest izolata bilo rezistentno. Tri izolata bilo je osjetljivo na TMP, dok je sedam ostalih izolata bilo rezistentno

na ovaj antibiotik. 100% rezistentnost KNS je pokazao na AX, CEF, DO, GM, L i T. Rezistencija na penicillin ustanovljena kod 6 izolata (60%), a na TMP kod 7 izolata (70%). Najveća rezistencija (100%) *Enterococcus faecalis* ustanovljena je na antibiotike AMC, AX, CEF, ENR, TMP, zatim na linkomicin (80%) i penicilin (60%). Najveća osjetljivost (100%) *Enterococcus faecalis* ustanovljena je na antibiotike doxycycline i gentamicin, što je prikazano u Tabeli 8.

Tabela 8 Osjetljivost izolata *Enterococcus faecalis* na antibiotike

<i>Enterococcus faecalis</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
2.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
3.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
4.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
5.	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
6.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
7.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
8.	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
9.	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
10.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R

R – rezistencija na antibiotik; S – osjetljivost; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Ispitivanjem osjetljivosti izolata *E. coli* na antibiotike ustanovljena je 100% osjetljivost na AMC, AX i penicillin, zatim na ENR (60%). Najveća rezistencija *E. coli* na antibiotike je ustanovljena na CEF, DO, GM, L, T, TMP, što je prikazano u Tabeli 9.

Tabela 9 Osjetljivost izolata *E. coli* na antibiotike

<i>E. coli</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
2.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
3.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
4.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
5.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
6.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
8.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
10.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R

R – rezistencija na antibiotik; S – osjetljivost; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Profili osjetljivosti izolata KNS na eterična ulja određeni su disk-difuzionom metodom i prikazani u Tabeli 10. Najveći antimikrobni potencijal na izolate KNS imaju eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum*. Svih deset izolata je pokazalo osjetljivost na ova eterična ulja. Četiri izolata su bila osjetljiva i šest izolata umjereno osjetljiva na eterično ulje *Origanum majorana*.

Tabela 10 Osjetljivost izolata KNS na eterična ulja

KNS	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	S	S
2.	S	I	S
3.	S	I	S
4.	S	I	S
5.	S	I	S
6.	S	S	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	S	S
10.	S	S	S

R – rezistencija; S – osjetljivost; I (intermediate) – umjereno osjetljiva

Profil osjetljivosti *Enterococcus faecalis* na eterična ulja disk difuzionom metodom prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 11 Osjetljivost izolata *Enterococcus faecalis* na eterična ulja

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	R	R	I
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	R	I
6.	S	R	S
7.	S	R	S
8.	S	R	S
9.	S	R	S
10.	S	R	S

R – rezistencija; S – osjetljivost; I (intermediate) – umjereno osjetljiva

Kod izolata *Enterococcus faecalis* drugi uzorak je pokazao rezistentnost na eterična ulja *Origanum compactum* i *Origanum majorana*, dok su svi ostali izolati pokazali rezistentnost samo na djelovanje eteričnog ulja *Origanum majorana*. Osam izolata *Enterococcus faecalis* bili su osjetljivi na djelovanje eteričnog ulja *Thymus serpyllum*, dok su dva izolata pokazala umjerenu osjetljivost. *Origanum compactum* je imao bolje antimikrobno djelovanje na izolate *Enterococcus faecalis* od eteričnog ulja *Thymus serpyllum*.

Profil osjetljivosti *E. coli* na eterična ulja disk-difuzionom metodom prikazan je u Tabeli 12. Najveći antimikrobni potencijal na izolate *E. coli* imala su eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum*, dok je eterično ulje *Origanum majorana* imalo umjereno osjetljivo dejstvo na 6, a rezistentno na 4 izolata (Tabela 12).

Tabela 12 Осјетљивост изолата *E. coli* на етерична уља

<i>E. coli</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	S	I	S
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	I	S
6.	S	R	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	I	S
10.	S	I	S

R – rezistencija; S – osjetljivost; I (intermediate) – umjereno osjetljiva

U ovom radu određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) za tri vrste eteričnih ulja *O. compactum*, *O. majorana* i *T. serpyllum* testirane na tri izolata i to *E. coli* izolat br. 10, KNS izolat 5 i *Enterococcus faecalis* izolat 10. Svih 10 izolata *E. coli* i KNS pokazali su osjetljivost na sve tri vrste eteričnih ulja *O. compactum*, *O. majorana* i *T. serpyllum*. Međutim svih 10 izolata *Enterococcus faecalis* bilo je rezistentno na eterično ulje *O. majorana*, te zbog toga minimalnu inhibitornu i baktericidnu koncentraciju nije bilo moguće odrediti. U Tabeli 13. su prikazane MIK i MBK testiranih eteričnih ulja.

Tabela 13 MIK i MBK eteričnih ulja testiranih na 3 izolata *E. coli*, KNS i *Enterococcus faecalis*

Eterično ulje	<i>O. compactum</i>		<i>O. majorana</i>		<i>T. serpyllum</i>	
Izolat	MIK (mg/ml)	MBK (mg/ml)	MIK (mg/ml)	MBK (mg/ml)	MIK (mg/ml)	MBK (mg/ml)
<i>E.coli</i> izolat 10	12	21	28,6	43	26	39
KNS izolat 5	14	21	17,2	43	19,5	39
<i>Enterococcus faecalis</i> izolat 10	10,5	16,8	R	R	17,2	43

Iz priloženih rezultata može se uočiti da eterično ulje *O. compactum* ima najniže minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije, te je identifikovano kao ulje sa najjačom antimikrobnom aktivnošću na sva tri testirana izolata. MIK vrijednosti za *O. compactum* se kreću od 10,5 mg/ml do 14 mg/ml, za razliku od *O. majorana* kod kojeg je najniža MIK vrijednost 17,2 mg/ml i *T. serpyllum* koji ima najnižu MIK vrijednost također od 17,2 mg/ml.

Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za antibiotik amoxicilin/clavulanic acid su pokazale najveću antimikrobnu aktivnost na testirane izolate. Svih 10 izolata *E. coli* i svih 10 izolata KNS bilo je osjetljivo na antibiotik amoxicillin/clavulanic acid, te je zbog toga ovaj antibiotik izabran za dalje testiranje. Međutim svih 10 izolata *Enterococcus faecalis* pokazalo je rezistenciju na ovaj antibiotik, te na ovom izolatu nije vršeno određivanje MIK i MBK vrijednosti navedenog antibiotika. MIK i MBK vrijednosti amoxicillin/clavulanic acid testirane su na dva izolata, a to su *E. coli* izolat 10 i KNS izolat 5. Iz priloženih rezultata može se uočiti da antibiotik amoxicillin/clavulanic acid pokazuje znatno niže MIK i MBK vrijednosti u odnosu na eterična ulja. Takav rezultat se i očekivao s obzirom da je ovaj antibiotik poznat kao izrazito jako antibakterijsko sredstvo. Međutim ne treba zanemariti antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja, te ih treba uzeti u razmatranje kao moguća alternativna antibakterijska sredstva, jer je dokazano da izrazito dobro djeluju na izolate testirane u ovom radu. Ukupno 3 izolata (*E. coli* izolat 10, KNS izolat 5 i *Enterococcus faecalis* izolat 10) analizirano je radi utvrđivanja sinergističkog efekta eteričnih ulja i antibiotika (FIC). Interakcije između antimikrobnih agenasa u kombinaciji određene su nakon određivanja MIK vrijednosti izračunavanjem indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FICI) za svaku kombinaciju antimikrobnih agenasa (*O. compactum* + *O. majorana*, *O. compactum* + *T. serpyllum*, *O. majorana* + *T. serpyllum*) prema sljedećoj formuli:

FIC antimikrobnog agensa A = MIC agensa A u kombinaciji / MIC samog agensa A

FIC antimikrobnog agensa B = MIC agensa B u kombinaciji / MIC samog agensa B

FICI (FIC indeks) = FIC agensa A + FIC agensa B

Dobijene vrijednosti FIC indeksa su interpretirane na sljedeći način:

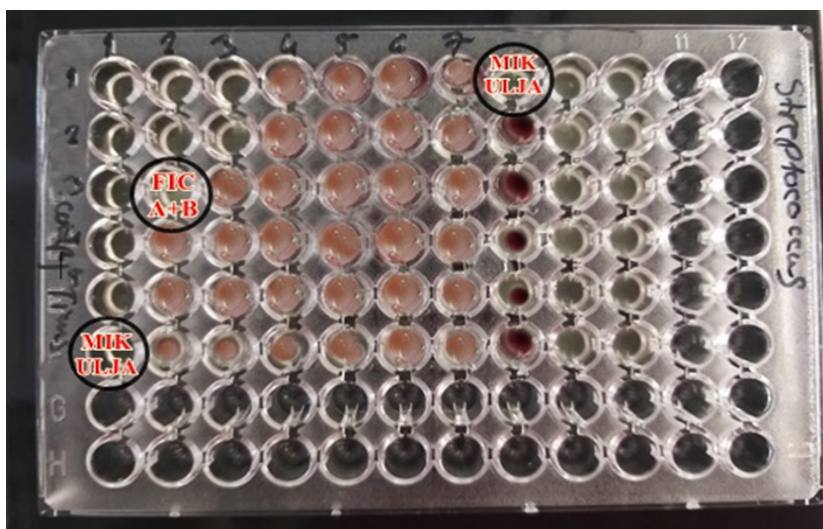
- sinergistički efekat agenasa $FICI \leq 0,5$
- aditivan efekat agenasa $0,5 < FICI \leq 1,0$
- indiferentan efekat agenasa $1,0 < FICI \leq 4,0$
- antagonistički efekat agenasa $FICI > 4,0$ (62).

Svi eksperimenti su izvedeni u dva nezavisna ponavljanja. Dobiveni rezultati predstavljeni su u Tabeli 14 i na Slici 2.

Табела 14 Синергистички ефекат између етеричних улја

Izolati	<i>O. compactum</i> + <i>O. majorana</i>		<i>O. compactum</i> + <i>T. serpyllum</i>		<i>O. majorana</i> + <i>T. serpyllum</i>	
	FIC	Efekat	FIC	Efekat	FIC	Efekat
<i>E. coli</i> izolat 10	0,31	SINERGIZAM	0,13	SINERGIZAM	0,18	SINERGIZAM
<i>KNS</i> izolat 5	FIC	Efekat	FIC	Efekat	FIC	Efekat
	0,18	SINERGIZAM	0,21	SINERGIZAM	0,20	SINERGIZAM
<i>Enterococcus faecalis</i> izolat 10	FIC	Efekat	FIC	Efekat	FIC	Efekat
	1	INDIFERENTAN	0,16	SINERGIZAM	1	INDIFERENTAN

FIC – Frakciona inhibitorna zona

Слика 2 Синергистичка интеракција између етеричних улја *O. compactum* и *T. serpyllum* идентифицирана на изолату *Enterococcus faecalis* br. 10. FIC индекс 0,16.

Sva tri eterična ulja (*O. compactum*, *O. majorana* i *T. serpyllum*) testirana na *E. coli* izolat 10, *KNS* izolat 5, *Enterococcus faecalis* izolat 10 pokazala su međusobnu interakciju označenu kao sinergizam. Kombinacije sva tri eterična ulja nisu prelazile FIC vrijednosti veće od 0,5, pri čemu su interakcije ovih eteričnih ulja označene kao sinergističke, što znači da pojedine komponente jednog eteričnog ulja

znatno pojačavaju efekat drugog eteričnog ulja, te daju zajednički pozitivni efekat. Izuzetak je izolat *Enterococcus faecalis* 10, kod kojeg je kombinacija eteričnog ulja *O. compactum* sa *O. majorana*, i kombinacija *O. majorana* sa *T. serpyllum* identificirana kao indiferentna. Kako je ranije navedeno, ovaj soj je bio rezistentan na eterično ulje *O. majorana*, te mješavina ovog ulja sa druga dva (*O. compactum* ili *T. serpyllum*) nije dala pozitivnu interakciju između ulja. Efekat ove kombinacije je indiferentan, što znači da *O. majorana*, bez obzira što je u kombinaciji sa nekim drugim uljem, ne pokazuje antimikrobno djelovanje na ovaj izolat.

DISKUSIJA

Mastitis je najčešća bolest mliječnih krava i ima dobro prepoznate štetne efekte na dobrobit životinja i profitabilnost farmi mliječnih proizvoda. Potpunije razumijevanje mastitisa nije bilo moguće sve dok se nije razvio mikroskop, koji je omogućio otkrivanje mikroorganizama koji su primarni etiološki agensi. Početna briga oko mastitisa temeljila se na javnom zdravlju i bila je usmjerena na smanjenje broja bakterija u sirovom mlijeku (Choi i sur., 2012). Razvoj pouzdanih testova za otkrivanje mastitisa je prioritet za istraživače, kojim žele osigurati javnu sigurnost, proizvoditi visokokvalitetne mliječne proizvode i imati praktična sredstva za upravljanje kravama oboljelim od mastitisa. Metode detekcije uključuju direktno mikroskopsko ispitivanje, brojanje somatskih stanica u mlijeku i izolaciju uzročnika (Adkins, 2017), čime smo se vodili i mi u našem istraživanju.

Broj somatskih stanica je dobar pokazatelj vjerovatnosti infekcije. Što je BSS viši, veća je vjerovatnost da su vime ili pojedine četvrti inficirane. Uredbom o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka (Propis, 1994) definisano je da prerađivači mlijeka u Bosni i Hercegovini mogu otkupljivati samo mlijeko koje zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011). Klasiranje sirovog mlijeka na prostorima Bosne i Hercegovine vrši se na osnovu izračunate geometrijske sredine za somatske stanice za posljednja tri mjeseca, a za mikroorganizme za posljednja dva mjeseca. Uzorci sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml se stavljaju van klase. Takvo mlijeko se povlači iz otkupa, a goveda se nakon analize sekreta vimena terapijaju antibioticima. Nakon provedene terapije i karence ponovo se analizira mlijeko na BSS i prisustvo antibiotika. Ukoliko je vrijednost nakon ponovljene analize manja od 400.000 BSS/ml mlijeka, ono se ponovo vraća u klasu i otkup. Ukupno 44 od 100 obrađenih uzoraka područja Gradačca u našem istraživanju instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica, a sa vrijednosti geometrijske sredine 400.000 BSS/ml i više stavljeni su van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa. Sa područja Kalesije je 36 uzoraka od ukupno 100 obrađenih uzoraka instrumentalnom metodom brojanja somatskih

stanica, a sa vrijednošću geometrijske sredine 400.000 BSS/ml i više, stavljeno van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa.

U svom istraživanju Murphy (1947) je primijetio da više od 20 vrsta bakterija može uzrokovati mastitis kod krava, a najmanje 99% tih infekcija uzrokuju *Str. agalactiae*, drugi streptokoki, stafilocoki i bacili (uključujući koliformne bakterije, *Pseudomonas* spp. itd.). Svoje istraživanje Eberhart (, 1977) je usmjerio ka istraživanju koliformnih bakterija kao uzročnika mastitisa. Objava njegovog istraživanja nagovijestila je svijest o rastućoj važnosti mastitisa uzrokovanog oportunističkim organizmima iz okoliša. U istraživanju koje je rađeno 2017. godine u Zeničkoj regiji (Bosna i Hercegovina), najčešći uzročnici mastitisa su bili koagulaza negativni stafilocoki u 13,04% uzoraka, *Klebsiella pneumoniae* u 13,04% uzoraka, *Enterococcus* spp. u 8,70% uzoraka, *E. coli* u 8,70% uzoraka, *Enterobacter*, *Serratia* spp. i *Yersinia enterocolitica* u 4,35% uzoraka (Burović, 2020).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali visok procenat bakterijskih uzročnika mastitisa. Uzročnici mastitisa utvrđeni su kod 43% uzoraka sa područja Gradačca i 36% uzoraka sa područja Kalesije. Rezultati identifikacije izolata pokazali su da se 8,5% izolata odlikovalo osobinama karakterističnim za KNS, *Enterococcus faecalis* 5%, a osobinama karakterističnim za *E. coli* se odlikovalo 26%. Ovi rezultati upućuju da su uzročnici mastitisa oportunističke bakterije iz okoliša. Iz rezultata brojanja somatskih stanica instrumentalnom metodom *Fossomatic* aparatom i izolacije uzročnika jasno se vidi da su uzorci sa povećanim BSS također i prema mikrobiološkim pokazateljima bili neispravni, te da su bakterije razlog povećanja istih.

Bakterijski izolati kliničkog mastitisa su uglavnom osjetljivi na antibiotike koji se koriste u terapiji, ali zbog sve većeg selektivnog pritiska zbog nekontrolisane upotrebe antibiotika u veterinarskoj medicini, procenat rezistentnih sojeva uzročnika mastitisa je u stalnom porastu. Dodatna pažnja treba biti usmjerena na upravljanje stadom, s posebnim naglaskom na higijenu. Upotreba bakterijske izolacije i ispitivanja antimikrobne osjetljivosti su ipak od izuzetnog značenja za izbor tretmana i nadzor antimikrobne rezistencije. Koagulaza negativni stafilocoki kod nas su izolirani u 8,5% slučajeva. Oni su najčešći izolat mastitisa goveda u mnogim zemljama i opisani su kao novi patogeni mastitisa. Na osnovu sadašnjeg znanja, teško je utvrditi ponašaju li se koagulaza negativni stafilocoki kao zarazni ili okolišni patogeni (Petrović, 2006). Pitkälä i sur. (2004) su pokazali da je *Enterococcus* spp. osjetljiv na penicilin i ampicilin, a studija Lambert i sur. (2001) pokazala je osjetljivost na ampicilin i otpornost na tetraciklin, dok su svi naši izolati *Enterococcus faecalis* pokazali osjetljivost za doxycycline i gentamicin, a potpunu rezistenciju na amoxicillin /clavulanic acid.

U novije vrijeme brojni autori su se bavili i proučavanjem efikasnih alternativa

antibioticima u liječenju mastitisa kod krava. U tom smislu eterična ulja su se pokazala sigurnom alternativom, jer su nakon dužeg izlaganja pokazala dobre antimikrobne karakteristike (Lambert i sur., 2001). Prethodna istraživanja su pokazala kako eterično ulje origana ima dobra antimikrobna svojstva kod svih *Staphylococcus* vrsta koje su bile rezistentne na antibiotike, te kod *E. coli* koja je bila rezistentna na više lijekova u liječenju mastitisa kod krava. Antibakterijski mehanizam eteričnog ulja origana potiče povećanje propusnosti bakterijske membrane, što dalje utiče na homeostazu pH i ravnotežu anorganskih iona. Fenolni spojevi eteričnog ulja origana inhibiraju rast bakterija mijenjanjem površine bakterijskih stanica, što može inhibirati prijanjanje bakterija na epitelne stanice vimena. Postoji mnogo studija u svijetu za procjenu antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja na uzročnike mastitisa, a za mnoga eterična ulja i njihove komponente utvrđivane su i minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije.

Prema istraživanju Choi i sur. (2012), origano eterično ulje koje se ubrizgavalo u upaljene četvrtine vimena dva puta dnevno tokom 3 dana u pojedinačnoj i dvostrukoj dozi dovelo je do poboljšanja stanja vimena. BSS se značajno smanjio u usporedbi s onima prije liječenja, a također *S. aureus* i *E. coli* nisu otkriveni u mlijeku četvrtog dana nakon tretmana. U literaturi postoji mali broj podataka o uticaju eteričnih ulja kod terapije mastitisa goveda u Bosni i Hercegovini. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da najveći antimikrobni potencijal na izolate KNS, uzročnika mastitisa, imaju eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum*, dok su ovi izolati pokazali umjerenu osjetljivost na eterično ulje *Origanum majorana*. Također eterično ulje *Origanum compactum* je ispoljilo visok antimikrobni učinak na izolate *Enterococcus faecalis* i *E. coli*, a eterično ulje *Origanum majorana* imalo je umjereno osjetljivo dejstvo. U istraživanjima u kojima se poredi antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja sa antibioticima, vrijednosti MIC aktivnih komponenti eteričnih ulja višestruko prevazilaze MIC antibiotika. Također iz rezultata našeg istraživanja može se uočiti da antibiotik amoxicillin/clavulanic acid pokazuje znatno niže MIK i MBK vrijednosti u odnosu na eterična ulja. Takav rezultat se i očekivao s obzirom da je ovaj antibiotik poznat kao izrazito jako antibakterijsko sredstvo. Međutim ne treba zanemariti antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja, te ih treba uzeti u razmatranje kao moguća alternativna antibakterijska sredstva, jer je dokazano da imaju izrazito visok antimikrobni potencijal na izolate testirane u ovom radu.

Mnoga eterična ulja imaju značajne antibakterijske, protugljivične i protuupalne učinke. Neke od njihovih glavnih komponenata, poput terpinen-4-ol, djeluju inhibirajući proupalnu ekspresiju citokina, stimulirajući proizvodnju protuupalnih citokina. Takva se opažanja mogu iskoristiti za poticanje bioterapije protiv mastitisa. Upotreba sintetičkih antibiotika sve se više obeshrabruje, jer njihova

prisutnost u mlijeku može imati potencijalne posljedice na zdravlje stanovništva i poljoprivredno-prehrambeni lanac (Souza i sur., 2013).

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su slijedeći zaključci:

1. Iz rezultata brojanja somatskih stanica instrumentalnom metodom *Fossomatic* aparatom (40% neispravnih uzoraka) i izolacije uzročnika (79 identifikovanih uzročnika) jasno se vidi da su uzorci sa povećanim BSS također i prema mikrobiološkim pokazateljima bili neispravni, te da su bakterije razlog povećanja istih. Na osnovu naših rezultata, a shodno Pravilniku o sirovom mlijeku, ukupno 40% uzoraka mlijeka bilo je van klase i povučeno je iz otkupa, a zatim su oboljela mliječna grla adekvatno tretirana antibioticima.
2. Ispitivanjem osjetljivosti izolata na antibiotike, najveća rezistencija kod KNS zabilježena je na antibiotik amoxicillin 30μg, cephalexin 30μg, doxycycline 30μg, gentamicin 30μg, lincomycin 30μg i oxytetracycline 30μg, dok je najveća osjetljivost zabilježena na amoxicillin/clavulanic acid 30μg i enrofloxacin 10μg. Najveća rezistencija na antibiotike izolata *Enterococcus faecalis* zabilježena je na amoxicillin/clavulanic acid 30μg, amoxicillin 30μg, cephalexin 30μg, enrofloxacin 10μg, trimethoprim/sulphamethoxazol 25μg. Osjetljivost kod svih izolata zabilježena je na antibiotike doxycycline 30μg i gentamicin 30μg. Ispitivanjem osjetljivosti izolata *E. coli* na antibiotike ustanovljena je osjetljivost na: amoxicillin/clavulanic acid 30μg, amoxicillin 30μg, penicillin 10μg. Rezistentnost kod svih izolata zabilježena je na cephalexin 30μg, doxycycline 30μg, gentamicin 30μg, lincomycin 30μg, oxytetracycline 30μg i trimethoprim/sulphamethoxazol 25μg.
3. Najveći antimikrobni potencijal su ispoljila eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum* na izolate KNS (100% osjetljivost), dok je 40% izolata bilo osjetljivi na eterično ulje *Origanum majorana*, a ostali izolati (60%) su bili umjereno osjetljivi na ovo eterino ulje. Izolati *Enterococcus faecalis* (90%) su bili osjetljivi na eterično ulje *Origanum compactum*, 80% izolata na *Thymus serpyllum*, a 100% rezistentnost su pokazali na eterično ulje *Origanum majorana*. Najveći antimikrobni potencijal su ispoljila eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum* na izolate *E. coli*. Eterično ulje *Origanum majorana* imalo je umjereno osjetljivo dejstvo na 60% izolata, a 40% izolata je bilo rezistentno na ovo eterično ulje.
4. Ispitivanjem MIK i MBK eteričnih ulja na po tri izolata *E. coli*, KNS i

Enterococcus faecalis, uočeno je da eterično ulje *O. compactum* ima najjaču antimikrobnu aktivnost na sva tri testirana izolata.

5. Sva tri eterična ulja (*O. compactum*, *O. majorana* i *T. serpyllum*) testirana na *E. coli* izolat 10, KNS izolat 5, *Enterococcus faecalis* izolat 10 pokazala su međusobnu interakciju. što znači da pojedine komponente jednog eteričnog ulja znatno pojačavaju efekat drugog eteričnog ulja, te daju zajednički pozitivni efekat. Izuzetak je jedan izolat *Enterococcus faecalis*. Kombinacija eteričnog ulja *O. compactum* sa *O. majorana* i kombinacija *O. majorana* sa *T. serpyllum* na izolat *Enterococcus faecalis* imala je indiferentan efekat, što znači da *O. majorana*, bez obzira što je u kombinaciji sa nekim drugim uljem, ne pokazuje antimikrobno djelovanje na ovaj izolat.
6. Antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja treba uzeti u razmatranje, jer može predstavljati zanimljiv izbor i alternativu za smanjenje upotrebe antibiotika u liječenju životinja oboljelih od mastitisa.

Izjava o sukobu interesa: Autor izjavljuje da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Adkins P. R. F., Middleton J. R., Fox L. K., Pighetti G., Petersson-Wolfe C. (2017): Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. 2017.
- Baćić G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Bannerman D. D. (2004): *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(3):463-72.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.*, 36(3):49-52.
- BioMérieux (2002): API 20E - Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Biomerieux.
- Burović J. (2020): Izolacija bakterijskih patogena kod klinički manifestnih mastitisa mliječnih goveda i njihova antimikrobna osjetljivost u zeničkoj regiji u 2017. godini. *Veterinarska stanica*, 51:47-52.
- Choi J.-Y., Damte D., Lee S.-J., Kim J.-C., Park S.-C. (2012): Antimicrobial Activity of Lemongrass and Oregano essential oil against standard antibiotic resistant and field isolates from chronic mastitis cow. *International Journal of Phytomedicine*, 4(1):134-139.
- CLSI (2014): M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility

- testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2012): M02-A11 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Clinical and laboratory standards institute.
- Eberhart R. J. (1977): Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170:1160-1163.
- Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui N.-E., Pagès J.-M., Hassani L. (2012): Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussoneti* essential oil against nosocomial infection bacteria. *Phytomedicine*, 19(5):464-471.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. (2001): A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.*, 91:453-462.
- Maksimović Z., Rifatbegović M. (2015): Osnovni principi kliničke bakteriologije. Veterinarski fakultet Sarajevo.
- Murphy J. M. (1947): The genesis of bovine udder infection and mastitis; the occurrence of streptococcal infection in a cow population during a seven-year period and its relationship to age. *Am. J. Vet. Res.*, 8:29-42.
- Petrović M. D., Petrović M. M., Nenadović, G., Kurćubić V., Marinkov G. (2006): Hemijski - mikrobiološki parametri kvaliteta sirovog kravljeg mleka. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(5-6):109-119.
- Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V., Honkanen-Buzalski T. (2004): Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, 87(8):2433-2441.
- Propis (1994): Uredba o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka. Službene novine Federacije Bosne i Hercegovine, 1/94.
- Propis (2011): Pravilnik o sirovom mlijeku. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 21/11.
- Schuster D. E., Kchirli M. E., Rainard P., Paape M. (1997): Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophilic recruitment during intramammary infection with *E. coli*. *Infect. Immun.*, 65:3286-92.
- Souza E. L., Oliveira C. E. V., Stamford T. L. M., Conceição M. L., Gomes Neto N. J. (2013): Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz J Microbiol.*, 44:29-35.
- White D., Walmsley M., Liew A., Claycomb R., Mein G. (2005): Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Research*, 72(1):115-121.

Рад примљен: 14.05.2023.

Рад прихваћен: 23.07.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301082H

UDK 636.2:618.19-002

Original Scientific Paper**SENSITIVITY OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED IN CASES OF
COW MASTITIS TO ANTIBIOTICS AND ESSENTIAL OILS****Sajma HUREMOVIĆ***

PI Veterinary Institute of the Tuzla Canton, Tuzla, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: Sajma Huremović, sajma.huremovic@vetzavodtk.ba

Summary

Mastitis is an inflammatory reaction of the udder caused by microorganisms, chemical or mechanical injuries. Bacterial mastitis, caused by several types of bacteria, is divided into two main groups: contagious mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis* and mastitis caused by the ubiquitous bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Proteus spp.* Currently, instead of using antibiotics, new strategies are being sought to reduce this clinical health problem. The aim of this study is to determine the sensitivity of bacterial strains causing mastitis to antibiotics and essential oils of oregano (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) and thyme (*Thymus serpyllum*). Mammary gland secretion samples, obtained by mechanical and manual methods, from dairy cows from the Kalesija and Gradačac areas were used. A total of 200 samples from dairy cows in different periods of lactation and age were examined. Mastitis control included determining somatic cells count in milk with the California mastitis test, or counting somatic cells on the Fossomatik apparatus, after which all samples with an increased number of somatic cells were microbiologically tested. Based on the obtained results, it can be concluded that there are justified reasons why the use of essential oils should be considered as an alternative to the use of antibiotics in the therapy of animals suffering from mastitis.

Key words: mastitis, pathogens, antibiotics, essential oils.**INTRODUCTION**

Mastitis is an inflammatory reaction of the udder tissue, mostly of microbial etiology. Infection occurs when an infectious factor penetrates the mammary gland

through the teat canal, begins to multiply and damage the udder tissue with its harmful metabolic products. The most common bacterial causes of mastitis are: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus species* (Bannerman, 2004). As a result of the infection, the pathogens and their toxins are excreted into the milk, which is then harmful to the health of the consumer. In the fight against the causative factor of mastitis, various strategies are applied, including regular udder health controls, prophylactic therapy during the dry period, vaccination, as well as the exclusion of diseased animals from production. When mastitis occurs during lactation, antibiotic therapy is often used. Long-term use of one antimicrobial substance destroys sensitive strains of pathogenic bacteria and selection that favors resistant strains of microorganisms occurs, which over time lead to the resistance. Bacteria have increasing antimicrobial resistance, and that represent one of the biggest public health problems that attracts the modern scientific public (Bačić, 2009). In the antimicrobial therapy of mastitis, various alternative substances with an antibacterial effect can be used, leading to the prevention of growth and reproduction or the destruction of the causative factor. For udder infections, essential oils and/or their active components can be used for preventive and therapeutic purposes. Essential oils that can be used in mastitis therapy come from plants such as: coriander (*Coriandrum sativum* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), sage (*Salvia officinalis* L.), thyme (*Thymus serpyllum*) and cloves (*Eugenia caryophyllata* Thunb). Among others, carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde and thymol were isolated as active components of these essential oils. The combined therapy of conventional antibiotics and essential oils is currently very interesting and represents a potential area for future research.

The aim of the study is to determine the sensitivity of the bacterial strains causing mastitis to some antibiotics and essential oils of oregano (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) and thyme (*Thymus serpyllum*). In order to achieve the goal of the study, the following tasks were set:

- isolation and identification of the causative factor of subclinical mastitis of cows using conventional bacteriological techniques,
 - determining somatic cells count,
 - determining the sensitivity of isolated strains of the causative factor of mastitis to antibiotics,
 - examination of the antibacterial effect of *Origanum compactum*, *Origanum*
-

majorana and *Thymus serpyllum* essential oils on isolated strains causing mastitis,

- determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations for essential oils and their synergistic effect.

MATERIALS AND METHODS

Mammary gland secretion samples of dairy cows from the Kalesija and Gradačac areas, obtained by machine milking, were used in this study. Milk samples taken from 200 dairy cows (100 samples from each area) were analyzed.

Isolation and identification of bacterial strains causing mastitis were carried out in the bacteriological laboratory of the PI Veterinary Institute of Tuzla Canton, while testing of the bacterial isolates sensitivity to antibiotics and essential oils was obtained in the microbiological laboratory of the Faculty of Science and Mathematics, University of Tuzla.

Milk samples for microbiological tests were taken aseptically, before milking. First, the udder was washed with warm water and soap, especially the papillae, and wiped with a clean cloth. Disinfection of the papillae tips was carried out with a cotton swab soaked in 70% ethanol, using the “to yourself” principle. First the further, and then closer quarters were disinfected, in order to avoid contamination of the already disinfected papillae. Three jets of milk were squeezed out of each quarter of the udder before sampling. After disinfection, each quarter was milked separately into sterile plastic bottles with a volume of 50 ml (Figure 1). After sampling, the milk samples were placed in a hand-held refrigerator (temperature 4°C) and transported to the laboratory for bacteriological examination.



Figure 1 Samples of udder secretions from diseased quarters for bacteriological analysis

Mastitis control included determining the somatic cells count in milk by the California mastitis test (CMT) (White et al., 2005), then counting somatic cells on the Fossomatik apparatus, after which all samples with an increased number of somatic cells were microbiologically tested.

The somatic cells count (SSC) is an indicator of the hygienic quality of milk and is a general indicator of the health of the udder. SSC directly indicates the mammary gland health. Somatic cells in milk originate from the udder and blood, and are most often leukocytes. An upper limit of 400 000 somatic cells (SS)/ml has been established for cow's milk, above which subclinical mastitis occurs. In the milk of healthy quarters, the number of somatic cells is less than 200 000 per ml, and they consist of epithelial cells and leukocytes (polymorphonuclear neutrophils, lymphocytes, macrophages). The Regulation on the method of sampling, classification and calculation of the price of milk (Regulation, 1994) defines that those who process milk can only buy milk that meets the criteria prescribed by the Regulation on raw milk (Regulation, 2011) and the calculation of the geometric mean.

Samples with a geometric mean of 400 000 SCC/ml are excluded from the classification. Blood agar is used to isolate *S. aureus* from cow mammary gland secretion samples, as it enables the growth of the most common bacterial pathogens under aerobic incubation conditions. For routine inoculation of udder secretions on blood agar, disposable plastic swabs with a volume of 0.01 ml are used. For larger volumes, swab sticks or pipettes can be used. The seeded substrates are incubated for 24 to 48 hours at 37°C in an inverted position. After incubation for 24 hours on blood agar, round, smooth, shiny colonies, with straight edges, slightly convex, pigmented, white or cream-colored, sometimes yellow and even orange, 1-2 mm in diameter grow. Also, they may show hemolysis. If there are no grown colonies, the incubation of the seeded samples is extended for another 24 hours. Gram-positive cocci with a characteristic arrangement in the form of clusters are visible on the Gram-stained microscopic preparation from the culture grown on blood agar. Characteristic beta hemolytic colonies from blood agar are inoculated on a selective Baird-Parker agar (BPA) medium on which staphylococci form colonies that are black, convex and shiny, 1-1.5 mm in diameter. Bacteria from the genus *Staphylococcus* produce the enzyme catalase, i.e. they are catalase positive. Confirmation of the production of this enzyme is done with 3-5% H₂O₂. Species of the genus *Staphylococcus* are differentiated according to their ability to coagulate plasma using the coagulase enzyme. *S. aureus* is coagulase positive, while other species of the genus *Staphylococcus* are coagulase negative. Bound coagulase is determined by a plate test, and free coagulase by a test tube. Certified reference strains were used as positive and negative controls (positive control *Staphylococcus*

aureus WDCM 00034, negative control *Staphylococcus epidermidis* WDCM 00036). A positive result is visible formation of clumps within 10 seconds, and a negative result means no visible formation of clumps. Isolation and identification of *Streptococcus* and *Streptococcus agalactiae* was done by incubating a sample of udder secretions on a blood medium for 24 hours at 37°C, and after incubation, the growth of characteristic colonies was visible on the plates. Colonies are small, grayish or airy, convex and compact (complete, rounded). Some strains require the presence of carbon dioxide to grow. Streptococci show hemolysis on blood agar. Colonies of *Enterococcus spp.* can have a zone of α hemolysis or be without hemolysis, they are grayish, shiny and not compact. Colonies that morphologically correspond to streptococci are inoculated onto the selective esculin azide agar medium and incubated for 24 hours at 37°C. Gram-positive cocci, round or ovoid, with a diameter of 0.6-1 μm , arranged in pairs and chains of different lengths, were found on a Gram-stained microscopic preparation from a culture grown on blood agar. To confirm *Str. agalactiae*, the CAMP test is used. This test detects the presence of CAMP factor (Christie, Atkins and Munch Peterson) – an extracellular protein that enhances beta hemolysis of *S. aureus*. It is positive at *Str. agalactiae*. The test is performed by dragging the staphylococcal culture along the blood agar with 10% sheep's blood, and then the tested strain of streptococcus is sown perpendicular to it in the form of a line starting from the end of the plate to near the staphylococcal line. A strain of *S. aureus* with a double zone of hemolysis is required to perform this test. After incubation at 35-37°C for 24 hours, it is observed whether there is a spear-shaped increase in hemolysis of streptococci near the staphylococcal line (Maksimović and Rifatbegović, 2015). Further identification was based on the analysis of a confirmatory test for the presence of intestinal enterococci by the breakdown of esculin. One typical colony was subcultured on bile esculin agar and incubated at 44°C for 48 hours. The identification of isolates to the species level was based on Gram staining of preparations, a negative catalase test and a biochemical test for the breakdown of sugars (sorbitol and arabinose). One colony was transferred with a sterile swab to the test tubes containing the mentioned sugars, and then the test tubes were incubated overnight at a temperature of 37°C. A positive reaction was read in the form of a change in the color of the sugar from pink to red, with noticeable turbidity, which is the main identification factor by which it is possible to distinguish between the two species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Enterococcus faecalis* has the ability to degrade sorbitol, but does not degrade arabinose, while *Enterococcus faecium* degrades arabinose, but does not degrade sorbitol. Isolation and identification of *E. coli* from udder secretion samples was also carried out by inoculating the sample and incubating it on a blood

medium for 24 hours at 37°C, and after incubation, large, smooth, shiny and round colonies appeared on the plates. Characteristic colonies are spread on MacConkey agar. On MacConkey agar, colonies change color to pink due to lactose fermentation. Identification with a Gram-stained microscopic preparation reveals Gram-negative bacteria in the shape of sticks, arranged individually or in pairs. For further identification, the API 20 E test (BioMérieux, 2002) was used, which is a standardized identification system for *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative bacteria. API 20 E strip consists of 20 micro tubes containing dehydrated substrates. These tests are inoculated with a bacterial suspension that reconstitutes the medium. During incubation, there is a change in color that is detected spontaneously or by the addition of reagents. Reactions are read in accordance with the attached table, and identification is done by referring to the Analytical Profile Index or using identification software. The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions. The result should be kept on the result sheet because it is an integral part of the final profile (Schuster, 1997). The sensitivity test to antibiotics and essential oils was performed on three bacterial isolates, and the Disc diffusion method was used according to the CLSI M02-A11 standard (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012) with the use of antibiogram discs (Conda pronadis, Micro & Molecular Biology, Spain): Amoxicillin/clavulanic acid 30µg, Amoxicillin 30µg, Cephalexin 30µg, Doxycycline 30µg, Enrofloxacin 10µg, Gentamicin 30µg, Lincomycin 30µg, Oxytetracycline 30µg, Penicillin 10µg, Trimethoprim/sulphamethoxazole 25µg. Interpretation of categories was done according to the same standard (CLSI, 2014). Due to its simplicity, the disc diffusion method has been routinely used for many years to determine the sensitivity of bacteria to antibiotics. The inoculum is prepared by diluting an 18-24 hours old pure bacterial culture. Four to five colonies are picked and transferred to 5 ml of physiological solution. The suspension is vortexed, and then the density of the suspension (turbidity) is adjusted by comparison with the 0.5 McFarland standard. The inoculum is sown evenly on the surface of the substrate with a swab, gauze or glass rod (Bauer, 1966). After sowing the inoculum, it is preferable to leave the substrate for 10-15 minutes at room temperature to dry the surface. Disc placement is performed with a dispenser or sterile tweezers. The distance between the discs is at least 3 cm, and the distance from the edge of the container is at least 1 cm. A maximum of 6 discs are applied to a plate with a diameter of 10 cm. The seeded substrates with antibiotic discs are incubated at the appropriate temperature in aerobic, microaerophilic or anaerobic conditions, depending on the type of bacteria being tested, and the plates are turned with the lid up. Since the thickness and composition of the nutrient medium can affect the results, the procedure is carried

out in accordance with the principles that standardize the methodology. After incubation at 37°C for 24 hours, the diameter of the growth inhibition zone of the tested bacterial strain for individual antibiotics is measured with a meter with a millimeter division. According to the CLSI M02-A11 standard, based on the measured values of the diameter of the growth inhibition zone, the degree of sensitivity is assessed and classified into one of three categories: S – sensitive - infection caused by a sensitive strain is treated with usual (optimal) therapeutic doses.; I- intermediate or moderately sensitive - infection caused by a moderately sensitive strain is treated with higher therapeutic doses of antibiotics; R- resistant - an infection caused by a resistant strain cannot be treated with the tested antibiotics. To test the antimicrobial sensitivity of bacteria to three essential oils *Thymus serpyllum*, *Origanum majorana* and *Origanum compactum* (Fadli, 2012), 10 isolates of coagulase-negative staphylococci (CNS), *Enterococcus faecalis* and *E. coli* were used. Bacteria were cultured on Baird-Parker agar, Slanetz Bartley agar, and MacConkey agar overnight to obtain single colonies. Colonies were then suspended in 0.9% sterile saline to achieve a turbidity equal to 0.5 McFarland standard (108 CFU/ml). After that Mueller Hinton agar was inoculated with bacterial suspension. 50 µl of each essential oil was applied to each plate in wells with a diameter of 6 mm. The plates were incubated for 24 hours at 35°C. Interpretation of the results was carried out by measuring the diameter of inhibition zones in millimeters. The criteria for evaluating the antimicrobial sensitivity of essential oils predict that an inhibition zone of less than 10 mm indicates the insensitivity and resistance of bacteria to the essential oil, 10 to 15 mm indicates a weak antimicrobial effect of the oil, 16 to 20 mm to a moderate antimicrobial effect and a zone of 20 mm to pronounced antimicrobial activity. The broth microdilution test (MIC) and the determination of the minimum bactericidal concentration of antimicrobial substances (MBC) were performed according to the standard (Lambert, 2001). MBC was performed after determining the MIC value, by spreading bacteria from the wells of the microtiter plate onto Mueller Hinton agar, both from the wells of the MIC value and from the wells of the four next higher concentrations. The diffusion test was also used to determine the antimicrobial effect of oregano and thymus essential oils on bacterial isolates (Choi et al., 2012). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution method, which represents the lowest tested concentration of essential oil at which there is no visible growth. This method is performed on microtiter plates containing 96 wells using MH broth, bacterial suspension and different concentrations of essential oil. The determination of the minimum inhibitory concentration was done by the use of the indicator substance 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC solution), which, due

to a change in color caused by a change in the pH value during culture growth, facilitates the determination of the obtained results.

The synergistic effect between essential oils on bacterial isolates causing cow mastitis was determined by the checkerboard method. This method determines the interaction and strength of two tested substances when they are used simultaneously, that is, the potential power of two essential oils as well as essential oils and antibiotics compared to their individual effect. Thus, this method determines the interaction and strength of two test substances (A and B) when used simultaneously, which is expressed as an FIC value (fractional inhibitory concentration). In this case, the antibiotic was designated as substance A, while the essential oil represented substance B. Based on previously determined MIC values, series of standard dilutions of substances A and B were made in order to test their combined interaction (initial concentrations for the preparation of dilutions are the MIC values of the tested substances and they decreased horizontally in the microtiter plate for the antibiotic, and vertically for the essential oil). After the preparation of serial dilutions of antimicrobial substances in microtiter plates, bacterial suspensions of the tested strains were prepared and added in the same way as in the tests for testing the antimicrobial activity of individual substances. In a microtiter plate with 96 wells, 90 μ L of inoculated MH broth and 10 μ L of a serial dilution of the combination of substances A and B were added in a certain order. The final volume in each well was 100 μ L, the final density of bacterial cells was 106 CFU/ml. The microtiter plates were incubated overnight at 35°C, and the results were read as described above with the addition of TTC. The lowest concentration of substance in the combination required to prevent the appearance of a red color was considered the MIC value. The obtained MIC values of the tested combinations were used to determine the FIC index and interpret the type of interaction between the antimicrobial components. We also analyzed the total number of somatic cells in the milk samples using the instrumental method of counting with the Fossomatic device (Fossomatic counting).

RESULTS

According to the CMT in the Kalesija area, 41 out of 100 processed samples were identified as unusable (25 were in trace, 23 were weak positive, 17 were distinct positive, and 1 was strongly positive). There were no cases of clinical mastitis in the Kalesija area. Given that CMT is an orientation procedure that indirectly provides insight into the number of somatic cells, we were interested in comparing the results obtained by the CMT procedure and Fossomatic counting.

Table 1 shows a comparison of the results of the CMT test and Fossomatic counting for the Kalesija area.

Table 1 Comparison of SSC obtained by CMT and the instrumental method - Kalesija area

Evaluation of the results of the instrumental method	Number of samples	Mean SSC	Assesment of reaction CMT	Number of samples	Mean SCC
negative (-)	47	119 124	negative (-)	34	241 778
weak positive (+)	17	386 273	trace (+/-)	25	337 561
pozitive (++)	19	1 259 682	weak positive (+)	23	906 385
strong positive (+++)	17	2 832 250	distinct positive (++)	17	1 851 941
			strong positive (+++)	1	5 971 000
			clinical mastitis	0	0

The geometric mean of negative samples was 119 124 for 47 samples according to the instrumental method in the Kalesija area, while it was 241 778 for 34 samples according to CMT.

Table 2 shows a comparison of the results of the CMT test and Fossomatic counting for the Gradačac area.

Table 2 Comparison of SSC obtained by CMT test and instrumental method - Gradačac area

Evaluation of the results of the instrumental method	Number of samples	Mean SCC	Assesment of reaction CMT	Number of samples	Mean SCC
negative (-)	49	205 846	negative (-)	35	125 090
weak positive (+)	7	373 333	trace (+/-)	19	267 231
positive (++)	21	938 500	weak positive (+)	16	841 263
strong positive (+++)	23	8 422 000	distinct positive (++)	27	1 447 867
			strong positive (+++)	2	6 474 000
			clinical mastitis	1	6 290 000

The geometric mean (mean value) of the somatic cells count in the Gradačac area, for negative samples, was 125 090 for 35 samples according to CMT, while it was 205 846 for 49 samples for the instrumental method. In accordance with the Regulation on raw milk (Regulation, 2011), samples were processed by the instrumental method, and if a geometric mean was 400 000 SCC/ml and more, samples were put out of classification and such milk was withdrawn from purchase. CNS as the cause of mastitis was identified in 8.5% of samples (17/200) (Table 3).

Table 3 CNS isolated from mammary gland secretions of cows

The causative factor	% of isolates from the Kalesija area	% of isolates from the Gradačac area
CNS	8	9

Enterococcus faecalis as the causative factor of mastitis was identified in 5% of samples (10/200) (Table 4).

Table 4 *Enterococcus faecalis* isolated from mammary gland secretions of cows

The causative factor	% of isolates from the Kalesija area		% of isolates from the Gradačac area
<i>Enterococcus faecalis</i>	6		4

E. coli as the cause of mastitis was identified in 26% of samples (52/200) (Table 5).

Table 5 *E. coli* isolated from mammary gland secretions of cows

The causative factor	% of isolates from the Kalesija area		% of isolates from the Gradačac area
<i>E. coli</i>	22		30

Results of somatic cells count using the instrumental method by Fossomatic apparatus and isolation of the causative factor (Table 6) indicate that the samples with increased SCC were also unusable according to the bacteriological findings, and that bacteria are the reason for their increase.

Table 6 Comparasion of somatic cells count using the instrumental method and isolated causative factors of mastitis

Gradačac area		Kalesija area	
% of unusable samples determined by the instrumental method of counting somatic cells	Total number of isolated causative factors	% of unusable samples determined by the instrumental method of counting somatic cells	Total number of isolated causative factors
44	43	36	36

In order to test the sensitivity profile of isolates of coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis* and *E. coli* to antibiotics, 10 isolates of each species were analyzed. The results are presented in Tables 7, 8 and 9. Interpretation of the results was carried out by measuring the diameter of inhibition zones in millimeters.

Table 7 Susceptibility of CNS isolates to antibiotics

KNS	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
2.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
3.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
5.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S
6.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
8.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
10.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S

R – antibiotic resistance; S – sensitivity; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P– penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

All ten CNS isolates showed sensitivity to AMC and ENR, four CNS isolates were sensitive to penicillin 10µg, while the other six isolates were resistant. Three isolates were sensitive to TMP, while seven other isolates were resistant to this antibiotic. CNS showed 100% resistance to AX, CEF, DO, GM, L and T. Resistance to penicillin was established in 6 isolates (60%), and to TMP in 7 isolates (70%).

The highest resistance (100%) of *Enterococcus faecalis* was found to antibiotics AMC, AX, CEF, ENR, TMP, then to lincomycin (80%) and penicillin (60%). The highest sensitivity (100%) of *Enterococcus faecalis* was found to the antibiotics doxycycline and gentamicin, which is shown in Table 8.

Table 8 Susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates to antibiotics

<i>Enterococcus faecalis</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
2.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
3.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
4.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
5.	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
6.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
7.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
8.	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
9.	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
10.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R

R – antibiotic resistance; S – sensitivity; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Testing the sensitivity of *E. coli* isolates to antibiotics, 100% sensitivity to AMC, AX and penicillin, and 60% to ENR was established. The highest resistance of *E. coli* to antibiotics was found to CEF, DO, GM, L, T, TMP, which is shown in Table 9.

Table 9 Susceptibility of *E. coli* isolates to antibiotics

<i>E. coli</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
2.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
3.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
4.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
5.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
6.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
8.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
10.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R

R – antibiotic resistance; S – sensitivity; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Sensitivity profiles of CNS isolates to essential oils were determined by the disk-diffusion method as shown in Table 10. The essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus serpyllum* have the greatest antimicrobial potential against CNS isolates. All ten isolates showed sensitivity to these essential oils. Four isolates were sensitive and six isolates intermediate sensitive to *Origanum majorana* essential oil.

Table 10 Sensitivity of CNS isolates to essential oils

KNS	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	S	S
2.	S	I	S
3.	S	I	S
4.	S	I	S
5.	S	I	S
6.	S	S	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	S	S
10.	S	S	S

R – resistance; S – sensitive; I – intermediate

The sensitivity profile of *Enterococcus faecalis* to essential oils using the disc diffusion method is shown in Table 11.

Table 11 Susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates to essential oils

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	R	R	I
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	R	I
6.	S	R	S
7.	S	R	S
8.	S	R	S
9.	S	R	S
10.	S	R	S

R – resistance; S – sensitive; I – intermediate

In the case of *Enterococcus faecalis* isolates, the second sample showed resistance to *Origanum compactum* and *Origanum majorana* essential oils, while all other isolates showed resistance only to the *Origanum majorana* essential oil. Eight isolates of *Enterococcus faecalis* were sensitive to the *Thymus serpyllum* essential oil, while two isolates showed intermediate sensitivity. *Origanum compactum* had better antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* isolates than *Thymus serpyllum* essential oil.

The sensitivity profile of *E. coli* to essential oils using the disc-diffusion method is shown in Table 12. The essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus serpyllum* had the greatest antimicrobial potential against *E. coli* isolates, while the essential oil of *Origanum majorana* had intermediate effect on 6, and resistant to 4 isolates (Table 12).

Table 12 Sensitivity of *E. coli* isolates to essential oils

<i>E. coli</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	S	I	S
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	I	S
6.	S	R	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	I	S
10.	S	I	S

R – resistance; S – sensitive; I – intermediate

In this study, minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined for three types of essential oils *O. compactum*, *O. majorana* and *T. serpyllum* tested on three isolates, namely *E. coli* isolate no. 10, CNS isolate 5 and *Enterococcus faecalis* isolate 10. All 10 *E. coli* and CNS isolates showed sensitivity to all three types of essential oils *O. compactum*, *O. majorana* and *T. serpyllum*. However, all 10 isolates of *Enterococcus faecalis* were resistant to the essential oil of *O. majorana*, and therefore the minimum inhibitory and bactericidal concentration could not be determined. Table 13 shows the MIC and MBC of the tested essential oils.

Table 13 MIC and MBC of essential oils tested on 3 isolates of *E. coli*, CNS and *Enterococcus faecalis*

Essential oil	<i>O. compactum</i>		<i>O. majorana</i>		<i>T. serpyllum</i>	
Izolates	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>E.coli</i> izolate 10	12	21	28.6	43	26	39
CNS izolate 5	14	21	17.2	43	19.5	39
<i>Enterococcus faecalis</i> izolate 10	10.5	16.8	R	R	17.2	43

Based on obtained results, it can be observed that the essential oil of *O. compactum*

has the lowest minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations, and was identified as the oil with the strongest antimicrobial activity on all three isolates tested. MIC values for *O. compactum* range from 10.5 mg/ml to 14 mg/ml, in contrast to *O. majorana* which has the lowest MIC value of 17.2 mg/ml and *T. serpyllum* which has the lowest MIC value also of 17.2 mg/ml.

Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations for the antibiotic amoxicillin/clavulanic acid showed the highest antimicrobial activity against the tested isolates. All 10 *E. coli* isolates and all 10 CNS isolates were sensitive to the antibiotic amoxicillin/clavulanic acid, and therefore this antibiotic was chosen for further testing. However, all 10 isolates of *Enterococcus faecalis* showed resistance to this antibiotic, and the MIC and MBC values of this antibiotic were not determined on this isolate. MIC and MBC values of amoxicillin/clavulanic acid were tested on two isolates, namely *E. coli* isolate 10 and CNS isolate 5. From the obtained results, it can be observed that the antibiotic amoxicillin/clavulanic acid shows significantly lower MIC and MBC values compared to ethereal oils. Such a result was expected considering that this antibiotic is known as an extremely strong antibacterial substance. However, the antibacterial activity of essential oils should not be ignored, and they should be taken into consideration as possible alternative antibacterial substances, because it has been proven that they have strong effect on the isolates tested in this study. A total of 3 isolates (*E. coli* isolate 10, CNS isolate 5 and *Enterococcus faecalis* isolate 10) were analyzed to determine the synergistic effect of essential oils and antibiotics (FIC). Interactions between combined antimicrobial components were determined after determining the MIC value by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) for each combination of antimicrobial components (*O. compactum* + *O. majorana*, *O. compactum* + *T. serpyllum*, *O. majorana* + *T. serpyllum*) according to the following formula:

FIC of antimicrobial component A = MIC of component A in combination / MIC of component A alone

FIC of antimicrobial component B = MIC of component B in combination / MIC of component B alone

FICI (FIC indeks) = FIC of component A + FIC of component B

The obtained FIC index values were interpreted as follows:

- synergistic effect of components $FICI \leq 0.5$
- additive effect of components $0.5 < FICI \leq 1.0$
- indifferent effect of components $1.0 < FICI \leq 4.0$
- antagonistic effect of components $FICI > 4.0$ (62).

All experiments were performed in two independent replicates. The obtained results are presented in Table 14 and Figure 2.

Table 14 Synergistic effect between essential oils

Izolates	<i>O. compactum</i> + <i>O. majorana</i>		<i>O. compactum</i> + <i>T. serpyllum</i>		<i>O. majorana</i> + <i>T. serpyllum</i>	
	FIC	Effect	FIC	Effect	FIC	Effect
<i>E. coli</i> isolate 10	0.31	SYNERGISM	0.13	SYNERGISM	0.18	SYNERGISM
<i>KNS</i> isolate 5	FIC	Effect	FIC	Effect	FIC	Effect
	0.18	SYNERGISM	0.21	SYNERGISM	0.20	SYNERGISM
<i>Enterococcus faecalis</i> isolate 10	FIC	Effect	FIC	Effect	FIC	Effect
	1	INDIFFERENT	0.16	SYNERGISM	1	INDIFFERENT

FIC – Fractional inhibitory zone

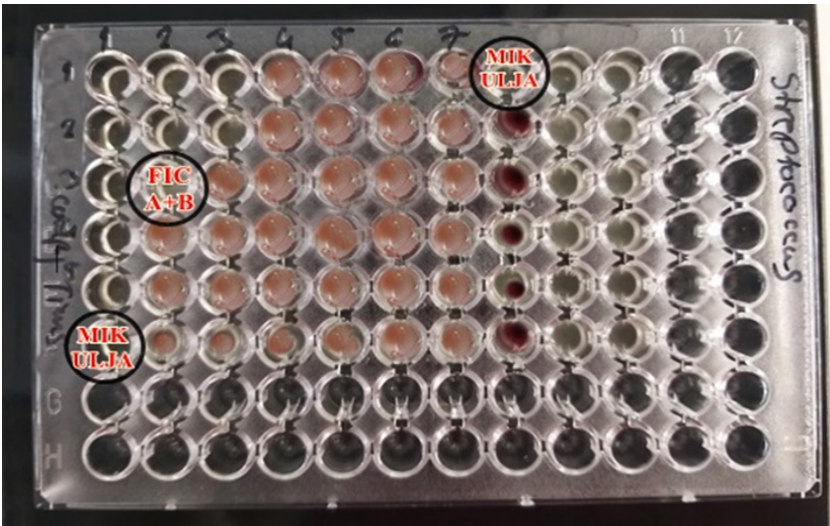


Figure 2 Synergistic interaction between essential oils of *O. compactum* and *T. serpyllum* identified on *Enterococcus faecalis* isolate no. 10. FIC index 0.16

All three essential oils (*O. compactum*, *O. majorana* and *T. serpyllum*) tested on *E. coli* isolate 10, *KNS* isolate 5, *Enterococcus faecalis* isolate 10 showed mutual

interaction marked as synergism. The combinations of all three essential oils did not exceed FIC values higher than 0.5, whereby the interactions of these essential oils are marked as synergistic, which means that individual components of one essential oil significantly enhance the effect of another essential oil, and give a combined positive effect. An exception is the isolate *Enterococcus faecalis* 10, in which the combination of the essential oil of *O. compactum* with *O. majorana*, and the combination of *O. majorana* with *T. serpyllum* were identified as indifferent. As previously stated, this strain was resistant to the essential oil of *O. majorana*, and the mixture of this oil with the other two (*O. compactum* or *T. serpyllum*) did not give a positive interaction between the oils. The effect of this combination is indifferent, which means that *O. majorana*, regardless of the fact that it is combined with some other oil, does not show an antimicrobial effect on this isolate.

DISCUSSION

Mastitis is the most common disease of dairy cows and has recognized negative effects on animal welfare and the profitability of dairy farms. A more complete understanding of mastitis was not possible until the microscope was developed, since it provided detection of the microorganisms that are the primary etiological factors. Initial concern about mastitis was based on public health and focused on reducing the number of bacteria in raw milk (Choi et al., 2012). The development of reliable tests for the detection of mastitis is a priority for researchers to ensure public safety, produce high-quality milk products and have practical tools of managing cows with mastitis. Detection methods include direct microscopic examination, milk somatic cells counting and isolation of the causative factor (Adkins, 2017). Those were the methods we used in our study.

The somatic cells count is a good indicator of the infection. If the SCC is higher, the probability that the mammary gland or individual quarters are infected is also higher. The Regulation on the method of sampling, classification and calculation of the price of milk (Regulation, 1994) defines that milk processors in Bosnia and Herzegovina can only buy milk that meets the criteria prescribed by the Regulation on raw milk (Regulation, 2011). The classification of raw milk in Bosnia and Herzegovina is based on the calculated geometric mean for somatic cells for the last three months, and for microorganisms for the last two months. Samples with a geometric mean of 400 000 SCC/ml are excluded from the classification. Such milk is withdrawn from purchase, and cattle are treated with antibiotics after analysis of mammary gland secretions. After the therapy and withholding period, the milk is analyzed again for SCC and the presence of antibiotics. If the value after repeated

analysis is less than 400 000 SCC/ml of milk, it is classified and purchased. A total of 44 out of 100 processed samples from the Gradačac area in our study using the instrumental method of somatic cell counting, and with a geometric mean value of 400 000 SCC/ml and more, were put out of classification and such milk was withdrawn from purchase. From the Kalesija area, 36 out of 100 samples processed by the instrumental method of counting somatic cells, with a geometric mean value of 400 000 SCC/ml and more, were put out of classification and such milk was withdrawn from purchase.

In the study obtained by Murphy (1947) it was noted that more than 20 species of bacteria can cause mastitis in cows, and at least 99% of these infections are caused by *Str. agalactiae*, other streptococci, staphylococci and bacilli (including coliform bacteria, *Pseudomonas spp.*, etc.). Eberhart (1977) focused his study on coliform bacteria as a cause of mastitis. The publication provoked awareness of the growing importance of mastitis caused by environmental opportunistic organisms. In the study conducted in 2017 in the Zenica region (Bosnia and Herzegovina), the most common causes of mastitis were coagulase-negative staphylococci in 13.04% samples, *Klebsiella pneumoniae* in 13.04% samples, *Enterococcus spp.* in 8.70% samples, *E. coli* in 8.70% samples, *Enterobacter*, *Serratia spp.* and *Yersinia enterocolitica* in 4.35% samples (Burović, 2020).

The results of our study showed a high percentage of bacterial causes of mastitis. The causative factors of mastitis were found in 43% samples from the Gradačac area and 36% samples from the Kalesija area. The results of isolate identification showed that 8.5% of the isolates had characteristic of CNS, 5% had characteristics of *Enterococcus faecalis*, and 26% had characteristics of *E. coli*. These results indicate that the causative factors of mastitis are opportunistic bacteria from the environment. From the results of counting somatic cells using Fossomatic apparatus and isolation of the causative factors, it is clear that the samples with increased SCC were also unusable according to microbiological indicators, and that bacteria are the reason for their increase.

Bacterial isolates of clinical mastitis are mostly sensitive to antibiotics used in therapy, but due to increasing selective pressure due to the uncontrolled use of antibiotics in veterinary medicine, the percentage of resistant strains of the causative factor of mastitis is constantly increasing. Additional attention should be focused on herd management, with special emphasis on hygiene. Bacterial isolation and antimicrobial susceptibility testing are of great importance for the choice of treatment and the monitoring of antimicrobial resistance. Coagulase-negative staphylococci were isolated in 8.5% cases. They are the most common isolate of bovine mastitis in many countries and have been described as new mastitis

pathogens. Based on current knowledge, it is difficult to determine if coagulase-negative staphylococci are infectious or environmental pathogens (Petrović, 2006). Pitkälä et al. (2004) showed that *Enterococcus spp.* is sensitive to penicillin and ampicillin, and the study by Lambert et al. (2001) showed sensitivity to ampicillin and resistance to tetracycline, while all our *Enterococcus faecalis* isolates showed sensitivity to doxycycline and gentamicin, and complete resistance to amoxicillin/clavulanic acid.

More recently, numerous authors have studied effective alternatives to antibiotics in the treatment of mastitis in cows. In this sense, essential oils are a safe alternative, because they show good antimicrobial characteristics after prolonged exposure (Lambert et al., 2001). Previous study has shown that oregano essential oil has good antimicrobial properties to all *Staphylococcus species* that were resistant to antibiotics, as well as to *E. coli* that was resistant to several drugs in the treatment of mastitis in cows. The antibacterial mechanism of oregano essential oil indicates an increase in the permeability of the bacterial membrane, which further affects pH, homeostasis and the balance of inorganic ions. Phenolic compounds in oregano essential oil inhibit bacterial growth by altering the surface of bacterial cells, which can inhibit bacterial adhesion to mammary gland epithelial cells. There are many studies in the world to evaluate the antimicrobial effect of essential oils on the causative factors of mastitis, and for many essential oils and their components, minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations have been determined.

According to study done by Choi et al. (2012), oregano essential oil injected into the inflamed quarters of the mammary gland twice a day for 3 days in a single and double dose led to an improvement of the udder condition. SCC decreased significantly compared to those before treatment, and *S. aureus* and *E. coli* were not detected in milk on the day four after treatment. In the literature, there is a small amount of data on the effect of essential oils in the treatment of bovine mastitis in Bosnia and Herzegovina. The results of our study showed that the essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus serpyllum* have the greatest antimicrobial potential against CNS isolates, the causative factor of mastitis, while these isolates showed moderate sensitivity to the essential oil of *Origanum majorana*. *Origanum compactum* essential oil also showed a high antimicrobial effect on *Enterococcus faecalis* and *E. coli* isolates, and *Origanum majorana* essential oil had an intermediate sensitive effect. In studies comparing the antibacterial activity of essential oils with antibiotics, the MIC values of the active components of essential oils significantly exceed the MIC of antibiotics. Also results in our study indicated that the antibiotic amoxicillin/clavulanic acid shows significantly lower MIC and

MBC values compared to essential oils. Such a result was expected considering that this antibiotic is known as an extremely strong antibacterial factor. However, the antibacterial activity of essential oils should not be ignored, and they should be taken into consideration as possible alternative antibacterial factors, because it has been confirmed that they have an extremely high antimicrobial potential against the isolates tested in this study.

Many essential oils have significant antibacterial, antifungal and antiinflammatory effects. Some of their main components, such as terpinen-4-ol, act by inhibiting proinflammatory cytokine expression, stimulating the production of antiinflammatory cytokines. Such observations can be used to stimulate biotherapy against mastitis. The use of synthetic antibiotics is discouraged, as their presence in milk can have potential consequences for population health and the agri-food supply chain (Souza et al., 2013).

CONCLUSION

Based on the obtained results, the following conclusions were made:

1. From the results of somatic cells counting using the instrumental method Fossomatic apparatus (40% of unusable samples) and isolation of the causative factor (79 identified causative factors), it is clear that the samples with increased SCC were also unusable according to microbiological indicators, and that bacteria are the reason for their increase. Based on our results, and in accordance with the Regulation on raw milk, a total of 40% of the milk samples were out of classification and were withdrawn from purchase, and then the affected milk cows were adequately treated with antibiotics.
 2. By examining the sensitivity of isolates to antibiotics, the highest resistance in CNS was observed to the antibiotic amoxicillin 30µg, cephalixin 30µg, doxycycline 30µg, gentamicin 30µg, lincomycin 30µg and oxytetracycline 30µg, while the highest sensitivity was observed to amoxicillin/clavulanic acid 30µg and enrofloxacin 10µg. The highest antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolates was observed to amoxicillin/clavulanic acid 30µg, amoxicillin 30µg, cephalixin 30µg, enrofloxacin 10µg, trimethoprim/sulphamethoxazole 25µg. The sensitivity of all isolates was observed to the antibiotics doxycycline 30µg and gentamicin 30µg. Testing the sensitivity of *E. coli* isolates, sensitivity to following antibiotics was observed: amoxicillin/clavulanic acid 30µg, amoxicillin 30µg, penicillin 10µg. Resistance in all isolates was observed to cephalixin 30µg, doxycycline
-

30µg, gentamicin 30µg, lincomycin 30µg, oxytetracycline 30µg and trimethoprim/sulphamethoxazole 25µg.

3. The greatest antimicrobial potential was shown by the essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus serpyllum* on CNS isolates (100% sensitivity), while 40% of the isolates were sensitive to the essential oil of *Origanum majorana*, and the other isolates (60%) were intermediate sensitive to this essential oil. Isolates of *Enterococcus faecalis* (90%) were sensitive to essential oil of *Origanum compactum*, 80% of isolates to *Thymus serpyllum*, and 100% showed resistance to essential oil of *Origanum majorana*. The essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus serpyllum* exhibited the greatest antimicrobial potential against *E. coli* isolates. *Origanum majorana* essential oil had a intermediate sensitive effect on 60% of the isolates, and 40% of the isolates were resistant to this essential oil.
4. By testing the MIC and MBC of essential oils on three isolates, *E. coli*, CNS and *Enterococcus faecalis*, it was observed that the essential oil of *O. compactum* has the strongest antimicrobial activity on all three tested isolates.
5. All three essential oils (*O. compactum*, *O. majorana* and *T. serpyllum*) tested on *E. coli* isolate 10, CNS isolate 5, *Enterococcus faecalis* isolate 10 showed mutual interaction, which means that individual components of one essential oil significantly enhance the effect of another essential oil, and give a common positive effect. An exception is one isolate of *Enterococcus faecalis*. The combination of the essential oil of *O. compactum* with *O. majorana* and the combination of *O. majorana* with *T. serpyllum* on the *Enterococcus faecalis* isolate had an indifferent effect, which means that *O. majorana*, regardless of whether it is combined with another oil, does not show antimicrobial activity to this isolate.
6. The antibacterial activity of essential oils should be taken into consideration, as it can represent an interesting choice and alternative for reducing the use of antibiotics in the treatment of animals suffering from mastitis.

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

REFERENCES

- Adkins P. R. F., Middleton J. R., Fox L. K., Pighetti G., Petersson-Wolfe C. (2017): Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. 2017.
- Bačić G. (2009): Diagnosis and treatment of mastitis in cows. Veterinary Faculty University of Zagreb.
- Bannerman D. D. (2004): *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(3):463-72.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.*, 36(3):49-52.
- BioMérieux (2002): API 20E - Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Biomerieux.
- Burović J. (2020): Isolation of bovine clinical mastitis bacterial pathogens and their antimicrobial susceptibility in the Zenica region in 2017. *Veterinarska stanica*, 51:47-52.
- Choi J.-Y., Damte D., Lee S.-J., Kim J.-C., Park S.-C. (2012): Antimicrobial Activity of Lemongrass and Oregano essential oil against standard antibiotic resistant and field isolates from chronic mastitis cow. *International Journal of Phytomedicine*, 4(1):134-139.
- CLSI (2014): M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2012): M02-A11 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Clinical and laboratory standards institute.
- Eberhart R. J. (1977): Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170:1160-1163.
- Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui N.-E., Pagès J.-M., Hassani L. (2012): Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussoneti* essential oil against nosocomial infection bacteria. *Phytomedicine*, 19(5):464-471.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. (2001): A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.*, 91:453-462.
- Maksimović Z., Rifatbegović M. (2015): Basic principle of clinical bacteriology. Veterinary Faculty Sarajevo.
- Murphy J. M. (1947): The genesis of bovine udder infection and mastitis; the occurrence of streptococcal infection in a cow population during a seven-year period and its relationship to age. *Am. J. Vet. Res.*, 8:29-42.

- Petrović M. D., Petrović M. M., Nenadović, G., Kurćubić V., Marinkov G. (2006): Chemical-microbial quality parameters of raw cow milk. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(5-6):109-119.
- Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V., Honkanen-Buzalski T. (2004): Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, 87(8):2433-2441.
- Regulation (1994): Regulation on the method of sampling, classification and calculation of the price of milk. Official Journal of Bosnia and Herzegovina, 1/94.
- Regulation (2011): Regulation on Raw Milk. Official Gazzete of Bosnia and Herzegovina, 21/11.
- Schuster D. E., Kchirli M. E., Rainard P., Paape M. (1997): Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrofilic recruitment during intramammary infection with *E. coli*. *Infect. Immun.*, 65:3286-92.
- Souza E. L., Oliveira C. E. V., Stamford T. L. M., Conceição M. L., Gomes Neto N. J. (2013): Influence of carvacrol and thymolon the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz J Microbiol.*, 44:29-35.
- White D., Walmsley M., Liew A., Claycomb R., Mein G. (2005): Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Research*, 72(1):115-121.

Paper received: 14.05.2023.

Paper accepted: 23.07.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301106A

UDK 577.175.8:597.552.512

Оригинални научни рад

ВЕРИФИКАЦИЈА И ПРОЦЈЕНА МЈЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА УТВРЂИВАЊЕ КОЛИЧИНЕ ХИСТАМИНА У РИБИ И ПРОИЗВОДИМА ОД РИБЕ

Јелена АНИЧИЋ*, Милијана ГОЛИЋ, Биљана ПЕЋАНАЦ

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

*Коресподентни аутор: Јелена Аничих, jelena.anicic@virs-vb.com

Сажетак

Циљ рада је приказати експерименталне резултате добијене при верификацији HPLC методе утврђивања садржаја хистамина у риби и производима од рибе за три врсте риба и производа од рибе и процијењену мјерну несигурност методе. Метода за утврђивање количине хистамина у риби и производима од рибе верификована је према BAS EN ISO 19343:2017. Оцијењени су следећи параметри верификације методе: утицај матрикса/линеарност, лимит квантификације, тачност, прецизност и процијењена је мјерна несигурност методе за три врсте рибе (туну, скушу и сардину). Доказана је линеарност у распону концентрација од 0 mg kg⁻¹ до 500 mg kg⁻¹ са коефицијентима корелације од 0,9925 до 0,9999. Лимит квантификације за све три врсте рибе износи 10 mg kg⁻¹. Тачност је оцијењена анализом контролних материјала преко искориштења и просјечна вриједност износи 96,61%. Прецизност је оцијењена у условима поновљивости и обновљивости на три концентрациона нивоа за три врсте рибе и изражена је као лимит поновљивости r и лимит обновљивости R . Лимити обновљивости R за туну износе 15,96 до 24,89%, за скушу 12,80 до 23,04%, а за сардину од 10,25 до 32,17%. Мјерна несигурност процијењена је на три концентрациона нивоа 25 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ и 220 mg kg⁻¹ и износи респективно за туну 17,78 mg kg⁻¹, 11,40 mg kg⁻¹ и 13,88 mg kg⁻¹, за скушу 16,46 mg kg⁻¹, 12,56 mg kg⁻¹ и 9,14 mg kg⁻¹, а за сардину 22,98 mg kg⁻¹, 12,70 mg kg⁻¹ и 7,32 mg kg⁻¹. Добијени резултати параметара верификације усаглашени су с прописаним и препорученим критеријумима прихватљивости, те потврђују да је метода испитивања довољно поуздана и лабораторија је може користити у рутинском раду.

Кључне ријечи: верификација, хистамин, хроматографија, риба, HPLC.

УВОД

Формирање хистамина у производима од рибе је у директној корелацији с концентрацијом хистидина у ткиву и нивоом микроорганизама присутних у производу (Etienne, 2016). Количина хистамина која настаје зависи од врсте бактерија, температуре и времена изложености рибе (Jakšić и сар., 2017). Неправилно складиштење, лоше третирање и манипулација рибом и производима од рибе доводи до кварења намирница, које код људи узрокује симптоме сличне алергијској реакцији, познато као „скомброидно тровање“ (хистамин или скомбротоксин). Зато је садржај хистамина од велике важности за процјену токсичности хране и предложен је као индикатор хигијенске исправности (Ghazi и сар., 2015). Ризик од тровања хистамином држи се под контролом примјеном добре хигијенске и произвођачке праксе, повезане са системом анализе ризика и критичних контролних тачака (Shimoji и Bakke, 2019).

Правилник о микробиолошким критеријумима за храну животињског поријекла (Пропис, 2019) прописује максимално дозвољене количине хистамина у производима рибарства од рибљих врста повезаних с великом количином хистидина, у опсегу од 100 до 200 mg kg⁻¹, које се процјењују анализом репрезентативних 9 јединица из сваке серије узорака. Узорак је адекватан, односно задовољава одредбе Правилника уколико: средња вриједност резултата из 9 јединица не прелази 100 mg kg⁻¹; двије јединице прелазе вриједност од 100 mg kg⁻¹, али не прелазе 200 mg kg⁻¹ и ако ни једна јединица не прелази 200 mg kg⁻¹. Изузетак су производи рибарства обрађени ензиматским сазријевањем у саламури произведени од рибљих врста повезаних с великом количином хистидина, код којих је дозвољени опсег од 200 до 400 mg kg⁻¹ на 9 јединица производа и рибљи сос добијен ферментацијом производа од риба, који не смије имати концентрацију хистамина већу од 400 mg kg⁻¹ у једној јединици производа (Пропис, 2019).

Раздвајање и квантификација биогених амина најчешће се постиже јоноизмјењивачком хроматографијом, танкослојном хроматографијом, гасном хроматографијом, течном хроматографијом и ензиматским и радиоимунолошким методама (Malle и сар., 1996). HPLC је најчешће кориштена због својих оперативних предности (цијене и поновљивости) (Chen и сар., 2016).

Правилником о микробиолошким критеријумима за храну животињског

поријекла (Пропис, 2019), прописана референтна метода за утврђивање количине хистамина у риби и производима од рибе је HPLC метода. С обзиром да је метода стандардна, већ је била предмет валидације и њена прикладност за предвиђену намјену је утврђена. Имајући ресурсе који су услов за извођење методе, лабораторија је имплементирала стандардну методу, те како би потврдила способност постизања тачних и поузданих резултата испитивања, креирала је и извела студију верификације.

Циљ рада је приказати експерименталне резултате добијене при верификацији HPLC методе утврђивања садржаја хистамина у риби и производима од рибе за три врсте риба и производа од рибе и процијењену мјерну несигурност методе.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У сврху верификације методе, анализе су изведене на узорцима три врсте рибе: туне (један узорак сирове рибе и пет производа: једна конзерва туне у саламури и четири конзерве туне у биљном уљу), скуше (један узорак сирове рибе и два производа: конзерве скуше у биљном уљу) и сардине (један узорак сирове рибе и један производ: конзерва сардине у биљном уљу). За оцјену параметара верификације поред обогачених узорака кориштени су и екстерно набављени контролни узорци: Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value $220 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$ и Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value $31,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($25,4\text{--}37,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

Кориштен је стандард хистамин дихидрохлорида, произвођач Sigma Aldrich, чистоће $\geq 99\%$, batch no: WXBD1225V, и интерни стандард 1,7-диаминохептан, произвођач Sigma Aldrich, чистоће 98% , batch no: STBG2472V. За анализу, од референтних стандарда припремљени су основни раствор хистамина, концентрације $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ растварањем $1,034 \text{ g}$ хистамина дихидрохлорида у 50 mL дејонизоване воде (раствор је стабилан једну годину ако се чува у замрзивачу ($-20 \pm 5^\circ\text{C}$)) и основни раствор интерног стандарда 1,7-диаминохептана, концентрације $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$, растварањем $0,320 \text{ g}$ 1,7-диаминохептана у 50 mL дејонизоване воде (раствор је стабилан три седмице ако се чува у фрижидеру ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)).

За припрему и обраду узорака кориштене су перхлорна киселина, натријум карбонат, данзил хлорид и L-пролин произвођача Sigma Aldrich, за пречишћавање екстракта толуен произвођача Honeywell, а за хроматографско раздвајање кориштени су ултрачиста вода и ацетонитрил, ацетонитрил HPLC grade, произвођача Fisher и Honeywell.

За филтрирање припремљеног узорка кориштени су PTFE/PP филтери величине пора 0,2 μm , а за упаравање гас азот 4.6.

Анализа је вршена на течном хроматографу са UV/VIS детектором, Agilent Technologies, InfinityLab LC Series 1260 Infinity II Quaternary System са припадајућим софтвером OpenLAB Chem Station Edition Rev. C.01.07 SR3 [465]. Кориштена је хроматографска колона Nucleosil C18, 5 μm 100Å (25 cm x 4,6 mm), Macherey-Nagel, LOT: 21301076.

Испитивање је рађено у складу с BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018).

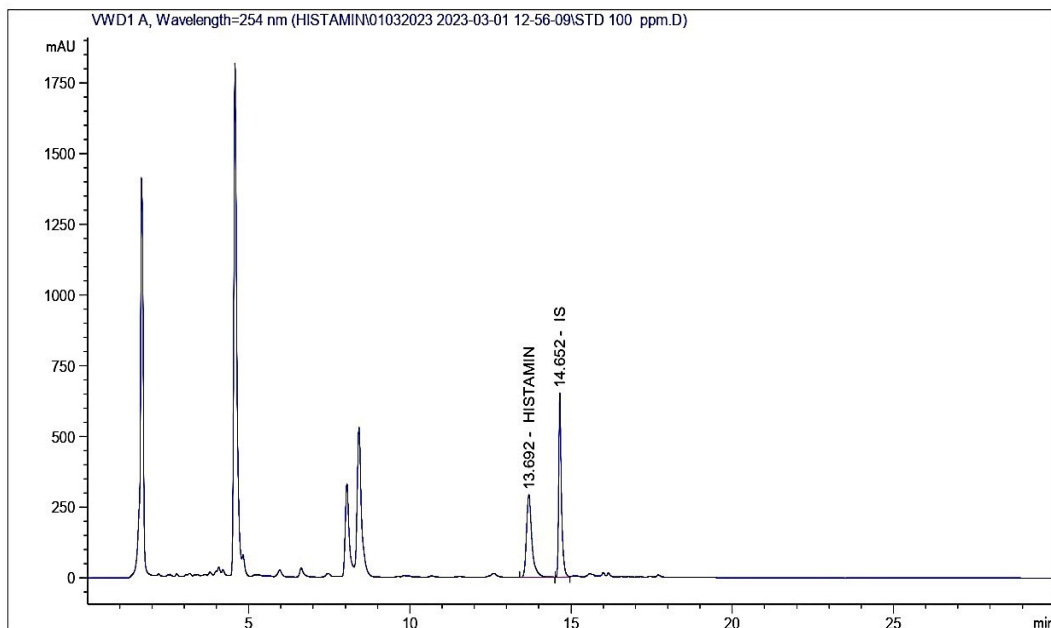
Калибрационе криве су рађене на матриксу исте врсте рибе као и узорак за анализу.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Експерименти су изведени у 15 радних серија од стране два аналитичара. Оцијењени су сљедећи параметри верификације: утицај матрикса/линеарност, лимит квантификације, тачност, прецизност преко поновљивости и обновљивости методе те је процијењена мјерна несигурност методе за три врсте рибе на три нивоа концентрације. Обухваћени су узорци три врсте рибе (туна, скуша и сардина) и узорци производа од ових врста.

Успостављање лимита прихватљивости за параметре верификације рађено је на основу прописаних (Пропис, 2010) и препоручених критеријума (ИСБИХ, 2018), те сопственог искуства и лабораторијске праксе.

Хроматограм с раздвојеним пиком хистамина и интерног стандарда с означеним ретенционим временима у минутима, приказан је на Слици 1.



Слика 1 Примјер специфичног хроматограма за хистамин и интерни стандард

Правилник о спровођењу аналитичких метода и тумачењу резултата (Пропис, 2010) прописује општи критеријум искориштења за квантитативне методе 80-110%, док BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018) наводи интервал од 60-140%. Један од разлога за овако широк интервал прихватљивости је тај што је метода BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018) валидована на основу резултата испитивања у оквиру интерлабораторијске студије у којој је учествовало девет лабораторија из седам држава, те овакав критеријум код верификације тачности у једној лабораторији није прихватљив. Имајући то у виду, лабораторија је као критеријум прихватљивости за оцјену искориштења (тачности методе) дефинисала интервал 80-120% и кроз експерименте доказала способност методе у погледу овог параметра верификације. Оцјена тачности методе изведена је анализом референтног материјала Faras TYG018RM Canned fish, Tuna fish in brine и контролног материјала Faras T27303QC Canned fish, у 6 понављања и анализом обогаћених узорка за три врсте рибе на концентрационом нивоу 400 mg kg^{-1} . У Табели 1 приказани су резултати за искориштење преко референтног и контролног материјала. У Табели 2 приказани су резултати за искориштење преко обогаћених узорка.

Табела 1 Искориштење преко RM и QC материјала

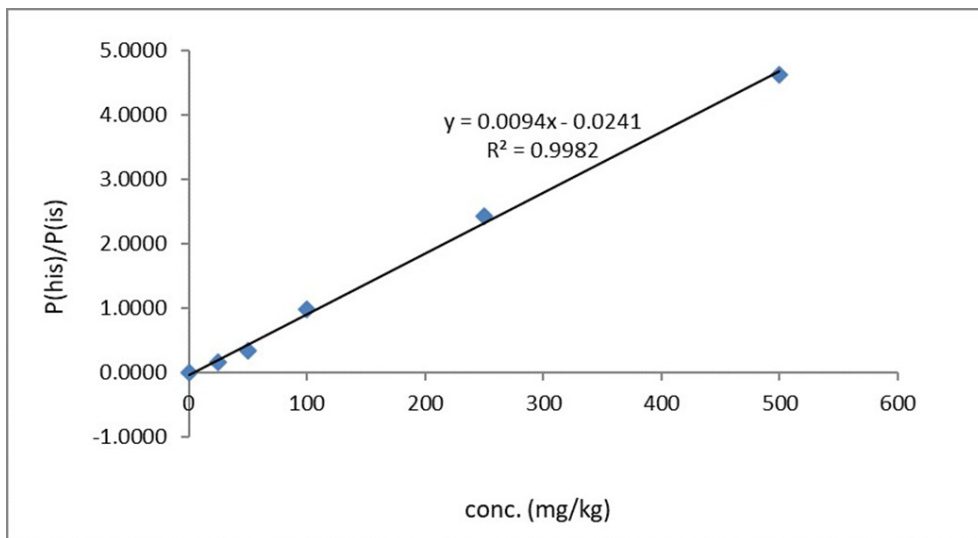
Параметар	Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value 220±5 mg kg ⁻¹	Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value 31,3 mg/kg (25,4-37,3 mg kg ⁻¹)
c _{sr} (mg kg ⁻¹)	208,1889	30,9996
sdv (mg kg ⁻¹)	1,5701	2,5217
Rec (%)	94,63	99,04

(c_{sr}): средња вриједност; (sdv): стандардна девијација; (Rec%): искориштењеТабела 2 Искориштење преко обогаћеног узорка на нивоу 400 mg kg⁻¹

Параметар	Туна	Скуша	Сардина
c _{sr} (mg kg ⁻¹)	385,6474	378,9199	391,5657
sdv (mg kg ⁻¹)	1,9049	3,4465	9,5088
Rec (%)	96,41	94,73	97,89

Тачност методе лабораторија је потврдила учешћем у РТ шеми од стране провајдера FAPAS у периоду август/септембар 2022., са z-score вриједношћу од 0,3 и средњом вриједношћу искориштења 97,6%, које је прихватљиво у односу на задати критеријум. Према Jakšić и сар. (2017), просјечно искориштење добијено истом методом анализом четири РТ (FAPAS) узорка на различитим концентрацијама хистамина износило је 101,5%, што је блиско просјечном искориштењу које смо добили анализама референтног и контролног материјала на два концентрациона нивоа (96,8%).

Доказана је линеарност методе у распону концентрација од 0 mg kg⁻¹ до 500 mg kg⁻¹ за све три врсте рибе с коефицијентима корелације од 0,9925 до 0,9999, и коефицијентима правца од 0,0070 до 0,0108. При свакој анализи је припремана калибрациона крива на узорку исте врсте као и узорак за испитивање. На овај начин се елиминише утицај матрикса и долази до поузданијег резултата. Примјер експериментално добијене калибрационе криве у матриксу приказан је на Слици 2.



Слика 2 Примјер експериментално добијене калибрационе криве у матриксу

Кроз податке из литературе, како за хроматографске тако и за ензимске методе, прихватљивим се сматра коефицијент корелације већи од 0,9. Jinadasa и сар. (2016) су линеарност методе анализе хистамина течном хроматографијом оцијенили коефицијентом корелације већим од 0,99, што је усаглашено с резултатима наших истраживања.

Мјерни опсег методе изражен је преко лимита квантификације. Узимајући у обзир максимално дозвољене количине хистамина прописане Правилником (Пропис, 2019), одабран је лимит квантификације као десет пута нижа вриједност од најниже прописане. Експеримент је постављен тако да је за сваку од три врсте рибе анализирано по шест узорака обогаћених на нивоу концентрације од 10 mg kg⁻¹. Израчунате су добијене концентрације, њихова средња вриједност (c_{sr}), стандардна девијација (sdv) и искориштење (Rec%). Добијени резултати приказани су у Табели 3. Искориштење обогаћених узорака на нивоу лимита квантификације је у прихватљивом опсегу и средња вриједност за три врсте рибе износи 105%.

Табела 3 Добијене експерименталне вриједности за лимит квантификације

Параметар	Туна	Скуша	Сардина
c_{sr} (mg kg ⁻¹)	10,2386	9,4321	11,8314
sdv (mg kg ⁻¹)	0,8908	0,3893	0,9817
Rec (%)	102,39	94,32	118,31

Када је ријеч о прецизности методе не постоји строго дефинисан критеријум за прихватљивост овог параметра верификације. Прецизност методе оцијењена је у условима поновљивости и обновљивости према BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018), те су израчунати r и R лимити. Поновљивост методе оцијењена је анализом обогаћених узорака у шест поновљених испитивања на три концентрациона нивоа. За сваки радни дан и сваку серију израчунате су средња вриједност концентрације (mg kg^{-1}), стандардна девијација (mg kg^{-1}), коефицијент варијације поновљивости (%), искориштење (%) и лимит поновљивости r (mg kg^{-1} , %). За оцјену поновљивости за врсту рибе туна на концентрационом нивоу 220 mg kg^{-1} кориштен је референтни материјал (TYG018RM). Резултат поновљивости једне радне серије за сва три матрикса дат је у Табели 4.

Табела 4 Оцјена поновљивости за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg^{-1})			100 (mg kg^{-1})			220 (mg kg^{-1})		
Врста рибе	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Број репликата	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Средња вриједност (mg kg^{-1})	24,95	26,15	28,95	108,42	101,43	107,63	187,78	221,14	229,35
Искориштење (%)	99,80	104,61	115,81	108,42	101,43	107,63	85,34	100,52	104,25
Стандардна девијација, s_r (mg kg^{-1})	1,22	2,09	0,72	2,37	1,86	3,85	4,91	9,97	8,65
Коефицијент варијације, CV_r (%)	4,88	7,99	2,50	2,19	1,83	3,58	2,23	2,22	3,77
Лимит поновљивости ($r = 2,8 \times s_r$) (mg kg^{-1})	3,41	5,85	2,03	6,64	5,21	10,78	13,76	27,92	24,24
Лимит поновљивости ($r = 2,8 \times CV_r$) (%)	13,66	22,37	7,00	6,13	5,12	10,02	6,24	6,22	10,56

Резултати валидационе студије ензиматске методе анализе хистамина на матриксу конзерва туне у уљу за искориштење су у опсегу 93,5-124,7%, а коефицијент варијације поновљивости на свим нивоима обогаћења < 20% (Shimoji и Bakke, 2019). У нашем истраживању је добијено искориштење за исту врсту матрикса у интервалу 85,34-101,43%, а коефицијент варијације поновљивости < 5% на сва три нивоа обогаћења (Табела 4). Овако различити резултати не изненађују с обзиром да је ријеч о двије методе с различитим принципом одређивања и различитим техникама мјерења.

Обновљивост методе оцијењена је анализом обогаћених узорак на три концентрациона нивоа за три врсте рибе од стране два аналитичара у различитим данима. Резултати добијени у експериментима за одређивање поновљивости методе за једног аналитичара обједињени су с резултатима добијеним за другог аналитичара за сваки ниво концентрације и сваку врсту рибе и израчунате средња вриједност концентрације (mg kg^{-1}), стандардна девијација (mg kg^{-1}), коефицијент варијације обновљивости (%), искориштење (%) и лимит обновљивости (mg kg^{-1} , %). У Табели 5 приказани су резултати за туну, скушу и сардину.

Табела 5 Оцјена обновљивости за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg^{-1})			100 (mg kg^{-1})			220 (mg kg^{-1})		
Врста рибе	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Број репликата	12	18	18	18	16	18	14	18	12
Средња вриједност (mg kg^{-1})	27,08	25,99	28,50	108,35	102,17	102,96	201,76	218,33	224,78
Искориштење (%)	108,32	103,95	114,01	108,35	102,17	102,96	91,70	99,24	102,17
Стандардна девијација, s_R (mg kg^{-1})	2,40	2,14	3,27	6,17	6,42	6,53	14,00	9,97	8,23
Коефицијент варијације, CV_R (%)	8,89	8,23	11,49	5,70	6,28	6,35	6,94	4,57	3,66
Лимит обновљивости ($R = 2,8 \times s_R$) (mg kg^{-1})	6,74	5,99	9,17	17,29	17,98	18,31	39,22	27,92	23,06
Лимит обновљивости ($R = 2,8 \times CV_R$) (%)	24,89	23,044	32,17	15,96	17,584	17,78	19,43	12,80	10,25

Добијени резултати за средње вриједности концентрације, искориштење, стандардне девијације и коефицијент варијације су слични за матрикс туна, док се за матриксе скуша и сардина резултати разликују у односу на просјечне вриједности дате у стандарду. Коефицијенти варијације за скушу и сардину су нижи од наведених у стандарду, а искориштења доста виша, посебно за сардину, која је кроз овај рад узета за поређење као сродна врста рибе у односу на харингу. Иако се разликују, добијене вриједности се не сматрају неусаглашеним у односу на оне дате у стандарду. Напротив, утврђена је боља прецизност, што је било и очекивано с обзиром на услове процјене овог параметра. Стандард је дефинисао прецизност на основу резултата интерлабораторијске студије, док је прецизност у нашим условима оцијењена интралабораторијски. Такође се не смије занемарити чињеница да су експерименти обухватили три врсте рибе и три нивоа концентрације, па стога добијени лимити не морају бити примјењиви на друге нивое концентрације и друге врсте рибе и њихових производа. Munir и сар. (2021) су одабрали скушу за оцјену прецизности и тачности на два концентрациона нивоа, средњем и вишем, у шест понављања, у току седам дана, при чему је добијен коефицијент варијације обновљивости 7,38%, а искориштење 103%, што одговара нашим експерименталним резултатима за скушу.

Мјерна несигурност методе је процијењена на основу резултата стандардне девијације испитивања хистамина у условима обновљивости за све три врсте рибе на сва три концентрациона нивоа уз употребу фактора осигурања 2, како би се досегао ниво повјерења од приближно 95%. Резултати су приказани у Табели 6 за туну, скушу и сардину.

Табела 6 Мјерна несигурност за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg ⁻¹)			100 (mg kg ⁻¹)			220 (mg kg ⁻¹)		
Врста рибе	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Коефицијент варијације, CV _R (%)	8,89	8,23	11,49	5,70	6,28	6,35	6,94	4,57	3,66
Проширена мјерна несигурност U = 2 x RSD (%)	17,78	16,46	22,98	11,40	12,56	12,70	13,88	9,14	7,32

Ghazi и сар. (2015) у својим експериментима утврдили су проширену мјерну несигурност (комбинована мјерна несигурност $\times 2$) за туну и остале врсте рибе која је износила 26,4%. Ова вриједност се може поредити са вриједношћу за проширену мјерну несигурност за сардину на најнижем концентрационом нивоу која износи 22,98 % и највиша је вриједност од експериментално добијених. Просјечна вриједност за проширену мјерну несигурност за све три врсте рибе је доста нижа од мјерне несигурности методе поменутих аутора.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата испитивања параметара верификације за рибу и производе од рибе, а узимајући у обзир критеријуме прихватљивости за линеарност, поновљивост, обновљивост, тачност, искориштење, границу квантификације (LOQ), метода је успјешно верификована, те се може исправно спроводити у рутинском раду.

Разлике у резултатима за исте параметре верификације међу лабораторијама не изненађују с обзиром да је ријеч о методама с различитим принципима одређивања и различитим техникама мјерења. Разлике такође потичу од различитих приступа оцјени параметара верификације у погледу одабира матрикса и извођења експеримента.

У којем обиму ће лабораторија у својим радним условима извести верификацију зависи од много фактора. Изазов је да се нађе компромис између могућности (вријеме, финансије) и оптималног броја експеримената на основу којих је могуће утврдити карактеристике методе и оцијенити их у односу на прописане и/или препоручене критеријуме прихватљивости.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Chen R., Deng Y., Yang L., Wang J., Xu F. (2016): Determination of Histamine by High-Performance Liquid Chromatography After Precolumn Derivatization with o-Phtalaldehyde-Sulfite. *Journal of Chromatografic Science*, 54(4):547-553.
- Etiene M. (2016): Methodology for histamine and biogenic amines analysis. Seafoodplus Traceability, Ifremer.
- Ghazi A. A., Mohamed M. M., Gad Alla S. A., Kennedy G., Atalla E. R. (2015): Optimization and Validation of Analytical Method for Determination of Histamine in Fish using HPLC-FLD. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 53(2):33-42.
-

- ИСБИХ (2018): Микробиологија ланца хране – Детекција и квантификација хистамина у риби и производима од рибе – HPLC метода. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 19343.
- Jakšić S., Baloš M. Ž., Mihaljev Ž., Prodanov Radulović J., Nešić K. (2017): Comparison of analytical methods for determination of histamine in reference canned fish samples. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85 012066:1-6.
- Jinadasa B. K. K. K., Jayasinghe G. D. T. M., Ahmad S. B. N. (2016): Validation of high performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative analysis of histamine in fish and fishery products. *Cogent Chemistry*, 2(1):1156806.
- Malle P., Vallé M., Bouqelet S. (1996): Assay of Biogenic Amines Involved in Fish Decomposition. *Journal of AOAC International*, 79(1):43-49.
- Munir M. A., Mackeen M. M. M., Heng L. Y., Badri K. H. (2021): Study of Histamine Detection using Liquid Chromatography and Gas Chromatography. *ASM Sc. J.*, 16:1-9.
- Пропис (2010): Правилник о спровођењу аналитичких метода и тумачењу резултата. Службени гласник Босне и Херцеговине, 95/10.
- Пропис (2019): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну животињског поријекла. Службени гласник Републике Српске 69/19.
- Shimoji K., Bakke M. (2019): Validation Study of Histamine Test for the Determination of Histamine in Selected fish Products. *Journal of AOAC International*, 102(1):164-180.

Рад примљен: 10.05.2023.
Рад прихваћен: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301118A

UDK 577.175.8:597.552.512

Original Scientific Paper

VERIFICATION AND ASSESSMENT OF THE MEASUREMENT UNCERTAINTY OF THE HPLC METHOD FOR DETERMINING THE AMOUNT OF HISTAMINE IN FISH AND FISHERY PRODUCTS

Jelena ANIČIĆ*, Milijana GOLIĆ, Biljana PEĆANAC

PI Veterinary Institute of the Republic of Srpska "Dr Vaso Butozan" Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: Jelena Aničić, jelena.anicic@virs-vb.com

Summary

The aim of the study is to present the experimental results obtained during the verification of the HPLC method for determining the histamine content in fish and fishery products for three types of fish and fishery products and to estimate measurement uncertainty of the method. The method for determining the amount of histamine in fish and fishery products is verified according to BAS EN ISO 19343:2017. The following parameters of the verification method were evaluated: influence of the matrix/linearity, limit of quantification, accuracy and precision. Measurement uncertainty of the method was estimated for three types of fish (tuna, mackerel and sardines). Linearity was confirmed in the concentrations range from 0 mg kg⁻¹ to 500 mg kg⁻¹ with correlation coefficients from 0.9925 to 0.9999. The limit of quantification for all three types of fish is 10 mg kg⁻¹. The accuracy was evaluated by analyzing the control materials through recovery and the average value is 96.61%. The precision was evaluated in terms of repeatability and reproducibility at three concentration levels for three types of fish and was expressed as the repeatability limit *r* and the reproducibility limit *R*. The reproducibility limits *R* for tuna are 15.96 to 24.89%, for mackerel 12.80 to 23.04%, and for sardines from 10.25 to 32.17%. The measurement uncertainty was estimated at three concentration levels 25 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ and 220 mg kg⁻¹ and was 17.78 mg kg⁻¹, 11.40 mg kg⁻¹ and 13.88 mg kg⁻¹ for tuna, 16.46 mg kg⁻¹, 12.56 mg kg⁻¹ and 9.14 mg kg⁻¹ for mackerel and 22.98 mg kg⁻¹, 12.70 mg kg⁻¹ and 7.32 mg kg⁻¹ for sardines. The obtained results of the verification parameters are in accordance with the prescribed and recommended acceptance criteria, and confirm that the test method is sufficiently reliable and the laboratory can use it in routine work.

Key words: verification, histamine, chromatography, fish, HPLC.

INTRODUCTION

The formation of histamine in fishery products is directly correlated with the histidine concentration in the tissue and the microorganisms level in the product (Etiene, 2016). The amount of histamine produced depends on the type of bacteria, temperature and time of exposure of the fish (Jakšić et al., 2017). Improper storage, poor handling and manipulation of fish and fishery products leads to food spoilage, which, in humans, causes symptoms similar to an allergic reaction, known as “scombroid poisoning” (histamine or scombrototoxin). That is why the histamine content is of great importance for the assessment of food toxicity and has been proposed as an indicator of hygienic correctness (Ghazi et al., 2015). The risk of histamine poisoning is kept under control by applying good hygiene and manufacturing practices, linked to a system of risk analysis and critical control points (Shimoji and Bakke, 2019).

The Regulation on Microbiological Criteria for Food of Animal Origin (Regulation, 2019) prescribes the maximum permitted amounts of histamine in fishery products from fish species associated with a large amount of histidine, in the range of 100 to 200 mg kg⁻¹, which are estimated by analyzing representative 9 units from each series of samples. The sample is adequate, that is, it meets the provisions of the Regulation if: the mean value of the results from 9 units does not exceed 100 mg kg⁻¹; two units exceed the value of 100 mg kg⁻¹ but do not exceed 200 mg kg⁻¹ and if no unit exceeds 200 mg kg⁻¹. Exceptions are fishery products processed by enzymatic maturation in brine produced from fish species associated with a large amount of histidine, where the allowed range is from 200 to 400 mg kg⁻¹ per 9 product units and fish sauce obtained by fermentation of fishery products, which must not have a histamine concentration greater than 400 mg kg⁻¹ in one product unit (Regulation, 2019).

Separation and quantification of biogenic amines is most often achieved by ion-exchange chromatography, thin-layer chromatography, gas chromatography, liquid chromatography, and enzymatic and radioimmunological methods (Malle et al., 1996). HPLC is most commonly used due to its operational advantages (cost and reproducibility) (Chen et al., 2016).

According to the Regulation on Microbiological Criteria for Food of Animal Origin (Regulation, 2019), the prescribed reference method for determining the amount of histamine in fish and fishery products is the HPLC method. Since the method is standard, it has already been subject to validation and its suitability for the intended purpose has been established. Having the resources that are a required for performing the method, the laboratory implemented a standard method, and in order to confirm

the ability to achieve accurate and reliable test results, a verification study was created and performed.

The aim of the study is to present the experimental results obtained during the verification of the HPLC method for determining the content of histamine in fish and fishery products for three types of fish and fishery products and to estimate measurement uncertainty of the method.

MATERIALS AND METHODS

In order to verify the method, analyzes were performed on samples of three types of fish: tuna (one sample of raw fish and five products: one canned tuna in brine and four canned tuna in vegetable oil), mackerel (one sample of raw fish and two products: canned mackerel in vegetable oil) and sardines (one sample of raw fish and one product: a canned sardines in vegetable oil). For the assessment of the verification parameters, in addition to enriched samples, externally ordered control samples were also used: Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value $220 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$ and Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value 31.3 mg kg^{-1} ($25.4\text{-}37.3 \text{ mg kg}^{-1}$).

The standard histamine dihydrochloride, manufactured by Sigma Aldrich, purity $\geq 99\%$, batch no: WXBD1225V, and the internal standard 1,7 diaminoheptane, manufactured by Sigma Aldrich, purity 98%, batch no: STBG2472V, were used. For the analysis, a basic 12.5 mg mL^{-1} histamine solution was prepared from the reference standards by dissolving 1.034 g of histamine dihydrochloride in 50 mL of deionized water (the solution is stable for one year if stored in a freezer ($-20 \pm 5^\circ\text{C}$)) and the stock solution of the internal standard 1,7-diaminoheptane, concentration 6.4 mg mL^{-1} was prepared by dissolving 0.320 g of 1,7-diaminoheptane in 50 mL of deionized water (the solution is stable for three weeks if stored in a refrigerator ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)).

Perchloric acid, sodium carbonate, dansyl chloride and L-proline produced by Sigma Aldrich were used for sample preparation and processing. Toluene produced by Honeywell was used for purifying the extract, and ultrapure water and acetonitrile, HPLC grade acetonitrile produced by Fisher and Honeywell were used for chromatographic separation.

PTFE/PP filters with a pore size of $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ were used for filtering the prepared sample, and nitrogen gas 4.6 was used for evaporation.

Analysis was performed on a liquid chromatograph with a UV/VIS detector, Agilent Technologies, InfinityLab LC Series 1260 Infinity II Quaternary System with

associated software OpenLAB Chem Station Edition Rev. C.01.07 SR3 [465]. A Nucleosil C18 chromatographic column, 5 μm 100Å (25 cm x 4.6 mm), Macherey-Nagel, LOT: 21301076, was used.

The test was performed in accordance with BAS EN ISO 19343 (ISBIH, 2018).

Calibration curves were made on the matrix of the same type of fish as the sample for analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments were performed in 15 batches by two analysts. The following verification parameters were evaluated: influence of the matrix/linearity, limit of quantification, accuracy, precision through repeatability and reproducibility of the method, and the measurement uncertainty of the method was estimated for three species of fish at three concentration levels. Samples of three types of fish (tuna, mackerel and sardines) and samples of their products were included.

The determination of acceptance limits for verification parameters was done on the basis of prescribed (Regulation, 2010) and recommended criteria (ISBIH, 2018), and own experience and laboratory practice.

The chromatogram with the separated peak of histamine and the internal standard with marked retention times in minutes is shown in Figure 1.

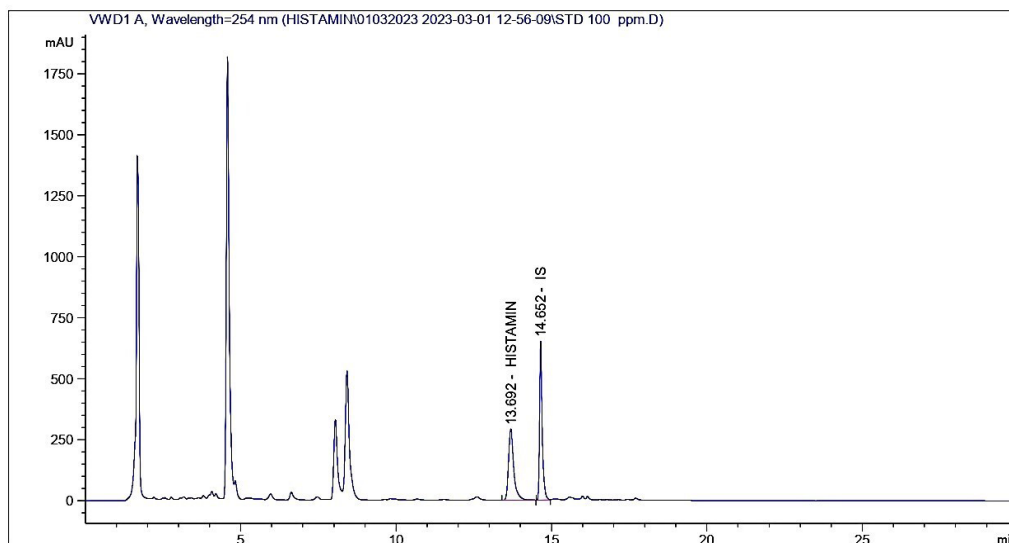


Figure 1 Example of a specific chromatogram for histamine and an internal standard

The Regulation on the Implementation of Analytical Methods and Interpretation of Results (Regulation, 2010) prescribes a general recovery criteria for quantitative methods of 80-110%, while BAS EN ISO 19343 (ISBIH, 2018) specifies an interval of 60-140%. One of the reasons for such a wide acceptance interval is that the BAS EN ISO 19343 method (ISBIH, 2018) was validated based on the results of an interlaboratory study in which nine laboratories from seven countries participated, and this criteria for accuracy verification in one laboratory is not acceptable. Bearing this in mind, the laboratory defined the 80-120% interval as an acceptance criteria for the evaluation of recovery (accuracy of the method) and through experiments confirmed the ability of the method related to this verification parameter. The accuracy of the method was evaluated by analyzing the reference material Fapas TYG018RM Canned fish, Tuna fish in brine and the control material Fapas T27303QC Canned fish, in 6 repetitions and by analyzing enriched samples for three types of fish at a concentration level of 400 mg kg⁻¹. Table 1 shows the results for recovery over the reference and control material. Table 2 shows the results for recovery over enriched samples.

Table 1 Recovery through RM and QC materials

Параметар	Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value 220±5 mg kg ⁻¹	Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value 31.3 mg/kg (25.4-37.3 mg kg ⁻¹)
c _m (mg kg ⁻¹)	208.1889	30.9996
sdv (mg kg ⁻¹)	1.5701	2.5217
Rec (%)	94.63	99.04

(c_m): mean value; (sdv): standard deviation; (Rec%): recovery

Table 2 Recovery through the enriched sample at the level of 400 mg kg⁻¹

Parameter	Tuna	Mackerel	Sardines
c _m (mg kg ⁻¹)	385.6474	378.9199	391.5657
sdv (mg kg ⁻¹)	1.9049	3.4465	9.5088
Rec (%)	96.41	94.73	97.89

The accuracy of the method was confirmed by participation of laboratory in the PT scheme by the FAPAS provider in the period August/September 2022, with a z-score value of 0.3 and a mean recovery value of 97.6%, which is acceptable in relation to the set criteria. According to Jakšić et al. (2017), the average recovery obtained by the same method by analyzing four PT (FAPAS) samples at different concentrations of histamine was 101.5%, which is close to the average recovery obtained by analyzing the reference and control material at two concentration levels (96.8%) .

The linearity of the method was confirmed in the range of concentrations from 0 mg kg⁻¹ to 500 mg kg⁻¹ for all three types of fish with correlation coefficients from 0.9925 to 0.9999, and coefficients of direction from 0.0070 to 0.0108. For each analysis, a calibration curve was prepared on a sample of the same type as the test sample. In this way, the influence of the matrix is eliminated and a more reliable result is obtained. An example of the experimentally obtained calibration curve in the matrix is shown in Figure 2.

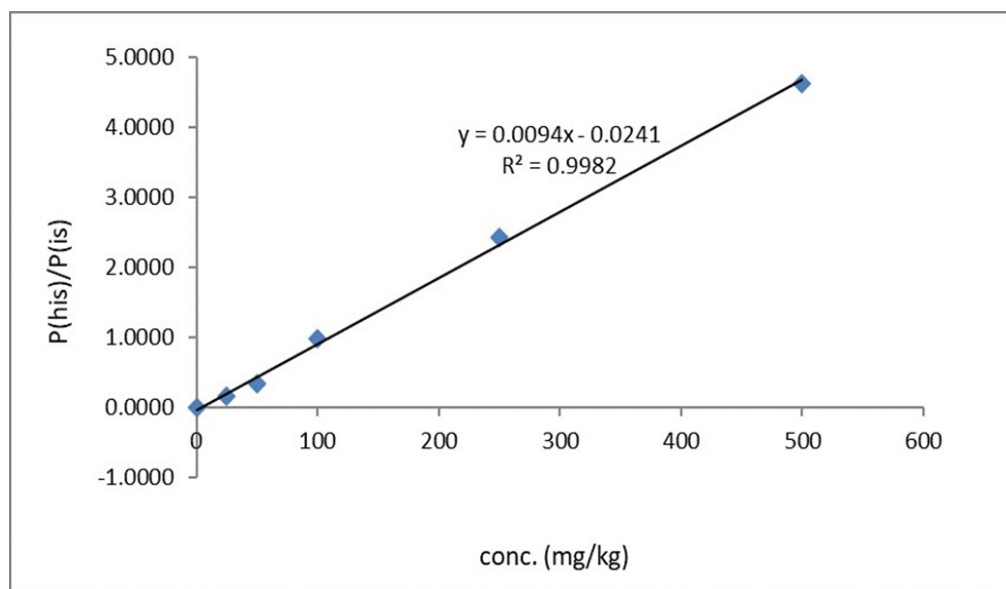


Figure 2 An example of an experimentally obtained calibration curve in a matrix

Based on literature data, for both chromatographic and enzymatic methods, a correlation coefficient higher than 0.9 is considered acceptable. Jinadasa et al. (2016)

evaluated the linearity of the histamine analysis method by liquid chromatography with a correlation coefficient higher than 0.99, which is consistent with the results of our study.

The measurement range of the method is expressed over the limit of quantification. Taking into account the maximum allowed amounts of histamine prescribed by the Regulation (Regulation, 2019), the limit of quantification was selected as ten times lower than the lowest prescribed value. The experiment was set up in a way that, for each of the three types of fish, six samples enriched at a concentration level of 10 mg kg^{-1} were analyzed. The obtained concentrations, their mean value (c_m), standard deviation (sdv) and recovery (Rec%) were calculated. The obtained results are shown in Table 3. The recovery of enriched samples at the level of the limit of quantification is in the acceptable range and the mean value for three types of fish is 105%.

Table 3 Obtained experimental values for the limit of quantification

Parameter	Tuna	Mackerel	Sardines
$c_m(\text{mg kg}^{-1})$	10.2386	9.4321	11.8314
sdv (mg kg^{-1})	0.8908	0.3893	0.9817
Rec (%)	102.39	94.32	118.31

When it comes to the precision of the method, there is no strictly defined criterion for the acceptability of this verification parameter. The precision of the method was evaluated in terms of repeatability and reproducibility according to BAS EN ISO 19343 (ISBIH, 2018), and r and R limits were calculated. The reproducibility of the method was assessed by analyzing enriched samples in six repeated tests at three concentration levels. For each working day and each batch, the mean concentration value (mg kg^{-1}), standard deviation (mg kg^{-1}), repeatability variation coefficient (%), recovery (%) and repeatability limit r (mg kg^{-1} , %) were calculated. The reference material (TYG018RM) was used to evaluate the reproducibility for the tuna at a concentration level of 220 mg kg^{-1} . The result of the repeatability of one working batch for all three matrices is given in Table 4.

Table 4 Reproducibility assessment for matrices: tuna, mackerel and sardines

Level of enrichment	25 (mg kg ⁻¹)			100 (mg kg ⁻¹)			220 (mg kg ⁻¹)		
A type of fish	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines
Number of replicates	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mean (mg kg ⁻¹)	24.95	26.15	28.95	108.42	101.43	107.63	187.78	221.14	229.35
Recovery (%)	99.80	104.61	115.81	108.42	101.43	107.63	85.34	100.52	104.25
Standard deviation, s_r (mg kg ⁻¹)	1.22	2.09	0.72	2.37	1.86	3.85	4.91	9.97	8.65
Coefficient of variation, CV_r (%)	4.88	7.99	2.50	2.19	1.83	3.58	2.23	2.22	3.77
Repeatability limit ($r = 2,8 \times s_r$) (mg kg ⁻¹)	3.41	5.85	2.03	6.64	5.21	10.78	13.76	27.92	24.24
Repeatability limit ($r = 2,8 \times CV_r$) (%)	13.66	22.37	7.00	6.13	5.12	10.02	6.24	6.22	10.56

The results of the validation study of the enzymatic method of histamine analysis on the matrix of canned tuna in oil for recovery are in the range of 93.5-124.7%, and the coefficient of variation of reproducibility at all levels of enrichment is < 20% (Shimoji and Bakke, 2019). In our study, the recovery for the same type of matrix was obtained in the interval 85.34-101.43%, and the coefficient of variation of reproducibility < 5% at all three levels of enrichment (Table 4). Such different results are not surprising considering that these are two methods with different determination principles and different measurement techniques.

The reproducibility of the method was evaluated by analyzing spiked samples at three concentration levels for three fish species by two analysts on different days. The results for the reproducibility of the method obtained by one analyst were combined with the results obtained by another analyst for each concentration level and each type of fish and the mean value of the concentration (mg kg⁻¹), standard deviation (mg kg⁻¹), coefficient of variation, reproducibility (%), recovery (%) and

reproducibility limit (mg kg^{-1} , %) were calculated. Table 5 shows the results for tuna, mackerel and sardines.

Table 5 Repeatability limit for matrices: tuna, mackerel and sardines

Level of enrichment	25 (mg kg^{-1})			100 (mg kg^{-1})			220 (mg kg^{-1})		
A type of fish	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines
Number of replicates	12	18	18	18	16	18	14	18	12
Mean (mg kg^{-1})	27.08	25.99	28.50	108.35	102.17	102.96	201.76	218.33	224.78
Recovery (%)	108.32	103.95	114.01	108.35	102.17	102.96	91.70	99.24	102.17
Standard deviation, s_r (mg kg^{-1})	2.40	2.14	3.27	6.17	6.42	6.53	14.00	9.97	8.23
Coefficient of variation, CV_r (%)	8.89	8.23	11.49	5.70	6.28	6.35	6.94	4.57	3.66
Repeatability limit ($r = 2,8 \times s_r$) (mg kg^{-1})	6.74	5.99	9.17	17.29	17.98	18.31	39.22	27.92	23.06
Repeatability limit ($r = 2,8 \times CV_r$) (%)	24.89	23.044	32.17	15.96	17.584	17.78	19.43	12.80	10.25

The obtained results for mean values of concentration, recovery, standard deviations and coefficient of variation are similar for the tuna matrix, while for the mackerel and sardines matrices the results differ in relation to the average values given in the standard. The coefficients of variation for mackerel and sardines are lower than those stated in the standard, and the recovery is much higher, especially for sardines, which is taken in this study as a fish species similar to herring. Although they differ, the obtained values are not considered inconsistent with those given in the standard. On the contrary, a better precision was determined, which was expected considering the conditions of assessment of this parameter. The standard defined precision based on the results of an interlaboratory study, while precision in our study was evaluated intralaboratory. It should also not be overlooked that the study included three types of fish and three levels of concentration, and therefore the obtained limits may not be applicable to other levels of concentration and other types of fish and their products. Munir et al. (2021) selected mackerel for the assessment of precision and

accuracy at two concentration levels, medium and higher, in six repetitions, during seven days, where the coefficient of variation of reproducibility was 7.38%, and the recovery was 103%, which corresponds to our experimental results for mackerel. The measurement uncertainty of the method was estimated based on the results of the standard deviation of the histamine test under reproducibility conditions for all three fish species at all three concentration levels using an assurance factor of 2, to reach a confidence level of approximately 95%. The results are shown in Table 6 for tuna, mackerel and sardines.

Table 6 Measurement uncertainty for matrices: tuna, mackerel and sardines

Level of enrichment	25 (mg kg ⁻¹)			100 (mg kg ⁻¹)			220 (mg kg ⁻¹)		
A type of fish	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines	Tuna	Mackerel	Sardines
Coefficient of variation, CV _R (%)	8.89	8.23	11.49	5.70	6.28	6.35	6.94	4.57	3.66
Expanded measurement uncertainty U = 2 x RSD (%)	17.78	16.46	22.98	11.40	12.56	12.70	13.88	9.14	7.32

Ghazi et al. (2015) determined the expanded measurement uncertainty (combined measurement uncertainty x 2) for tuna and other types of fish, which was 26.4%. This value can be compared with the value for the expanded measurement uncertainty for sardines at the lowest concentration level, which is 22.98% and is the highest value obtained experimentally. The average value for the extended measurement uncertainty for all three types of fish is much lower than the measurement uncertainty of the method of the mentioned authors.

CONCLUSION

Based on the obtained results of the verification parameters test for fish and fishery products, and taking into account the acceptance criteria for linearity, repeatability, reproducibility, accuracy, recovery, limit of quantification (LOQ), the method was successfully verified and can be implemented in routine work.

Differences in results for the same verification parameters between laboratories

are not surprising considering that these are methods with different determination principles and different measurement techniques. The differences also originate from different approaches to the estimation of the verification parameters in terms of matrix selection and experiment design.

The extent to which the laboratory will carry out verification in its working conditions depends on many factors. The challenge is to find a compromise between the possibilities (time, finances) and the optimal number of experiments on the basis of which it is possible to determine the characteristics of the method and evaluate them in relation to the prescribed and/or recommended acceptance criteria.

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

REFERENCES

- Chen R., Deng Y., Yang L., Wang J., Xu F. (2016): Determination of Histamine by High-Performance Liquid Chromatography After Precolumn Derivatization with o-Phtalaldehyde-Sulfite. *Journal of Chromatografic Science*, 54(4):547-553.
- Etiene M. (2016): Methodology for histamine and biogenic amines analysis. Seafoodplus Traceability, Ifremer.
- Ghazi A. A., Mohamed M. M., Gad Alla S. A., Kennedy G., Atalla E. R. (2015): Optimization and Validation of Analytical Method for Determination of Histamine in Fish using HPLC-FLD. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 53(2):33-42.
- ISBIH (2018): Microbiology of the food chain – Detection and quantification of histamine in fish and fishery products – HPLC method. Institute for standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 19343.
- Jakšić S., Baloš M. Ž., Mihaljev Ž., Prodanov Radulović J., Nešić K. (2017): Comparison of analytical methods for determination of histamine in reference canned fish samples. *IOP Conference Series: Eart and Environmental Science Sci.*, 85 012066:1-6.
- Jinadasa B. K. K. K., Jayasinghe G. D. T. M., Ahmad S. B. N. (2016): Validation of high performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative analysis of histamine in fish and fishery products. *Cogent Chemistry*, 2(1):1156806.
- Malle P., Vallé M., Bouqelet S. (1996): Assay of Biogenic Amines Involved in Fish Decomposition. *Journal of AOAC International*, 79(1):43-49.
-

- Munir M. A., Mackeen M. M. M., Heng L. Y., Badri K. H. (2021): Study of Histamine Detection using Liquid Chromatography and Gas Chromatography. *ASM Sc. J.*, 16:1-9.
- Regulation (2010): The Regulation on the Implementation of Analytical Methods and Interpretation of Results. Official Gazette of the Bosnia and Herzegovina, 95/10.
- Regulation (2019): The Regulation on Microbiological Criteria for Food of Animal Origin. Official Gazette of the Republic of Srpska 69/19.
- Shimoji K., Bakke M. (2019): Validation Study of Histamine Test for the Determination of Histamine in Selected fish Products. *Journal of AOAC International*, 102(1):164-180.

Paper received: 10.05.2023.

Paper accepted: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301130G

UDK 539.16:579.67

Оригинални научни рад

МИКРОБИОЛОШКА ЧИСТОЋА У ЛАНЦУ ХРАНЕ

**Бојан ГОЛИЋ^{1*}, Драго Н. НЕДИЋ², Драган КАСАГИЋ¹,
Амела ЈАМАКОВИЋ³**

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

²Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

³Јавна установа Ветеринарски завод Тузланског кантона, Тузла, Босна и
Херцеговина

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

Сажетак

Поред микробиолошких критеријума за храну (критеријуми безбједности хране и критеријуми хигијене у процесу производње), микробиолошки критеријуми чистоће су веома важна карика у микробиологији ланца хране. Узорци брисева опреме, уређаја, прибора, радних површина, радне одјеће и руку радника у производњи, преради и промету у објектима и превозним средствима који долазе у контакт с храном, гдје постоји опасност од појаве и ширења заразне болести, коришћени су за испитивање. Испитивани узорци потичу из објеката за производњу, прераду и дистрибуцију хране, ресторана и других угоститељских објеката у којима се служи храна, објеката у области васпитања, образовања и социјалне заштите (објекти за смјештај лица) и превозних средстава која долазе у контакт с храном. Испитивање је обављено током 2020. године и обухватило је 2.958 узорака. Лабораторијско испитивање узорака брисева вршено је методама BAS EN ISO 4833-1:2014, BAS EN ISO 21528-2:2018, BAS EN ISO 11290-1:2018 и BAS EN ISO 6579-1:2018. Циљ истраживања је да се процијени стање микробиолошке чистоће у ланцу хране. Од укупног броја испитаних узорака брисева, 94,22% је било задовољавајуће, а 5,78% је било незадовољавајуће. Посматрано у односу на укупан број испитаних узорака, 77,19% узорака је било незадовољавајуће због повећаног броја аеробних микроорганизама на 30°C, а 22,81% због повећаног броја *Enterobacteriaceae*. Патогени *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* нису

изоловани ни у једном узорку бриса. Добијени резултати указују да је општи ниво хигијене у производњи и дистрибуцији хране на високом нивоу, посебно због одсуства патогена *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*, али да и даље постоји ризик од контаминације *Enterobacteriaceae*, које су индикатори хигијена процеса производње.

Кључне ријечи: микробиолошка чистоћа, ланац хране, број микроорганизама, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*.

УВОД

Поред микробиолошких критеријума за храну (критеријуми безбједности хране и критеријуми хигијене у процесу производње), микробиолошки критеријуми чистоће су веома важна карика у микробиологији ланца хране. Просторије у којима се рукује храном, превозна средства, предмети, прибор и опрема који долазе у контакт с храном морају се редовно одржавати (механичко чишћење и прање) и дезинфиковати како би се избјегао сваки ризик од контаминације, а храна и особље морају бити под редовним надзором (Пропис, 2004). Руковаоци храном морају одржавати висок ниво личне хигијене и носити одговарајућу заштитну одјећу, и бити обучени о захтјевима хигијене хране (Gill и Jones, 1999). Неправилно чишћење и дезинфекција директно су повезани с појавом разних болести које се преносе храном (Johns, 1991). Обука особља које рукује храном, у вези с основним концептом и захтјевима личне хигијене, саставни је дио мјера за добијање безбједног производа за потрошача (Adams и Moss, 1997).

У микробиолошком прегледу брисева, процјена хигијене површина углавном се заснива на одређивању броја аеробних микроорганизама на 30°C и *Enterobacteriaceae* по cm² (Aarnisalo и сар., 2006). Поред ових, понекад се врши испитивање и на присуство других микроорганизама, јер је доказано да *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и фекалне стрептококе потичу од заражених особа које рукују храном (Lawrie, 1998).

На површинама које долазе у контакт с готовом храном потребно је вршити испитивања присуства *Listeria monocytogenes* као узрочника листериозе, тешке заразне болести људи и животиња (Aguado и сар., 2001; Lundén и сар., 2002; Lundén и сар., 2003; Suihko и сар., 2002; Fonnesbech-Vogel и сар., 2001). Истраживања Samelis и Metaxopoulos (1999) указују да је, у процесу

производње хране, животна средина чешћи извор *Listeria monocytogenes* него живе животиње и лешеви, тако да треба обратити посебну пажњу на процес чишћења и дезинфекције.

Због ризика по јавно здравље, у производњи, преради и промету спроводе се обавезна испитивања на *Listeria monocytogenes* у пословању готовом храном и на *Salmonella* spp. у пословању месом, полупроизводима и производима од меса (Пропис, 2012; Пропис, 2019).

Важећом регулативом дефинисани су критеријуми микробиолошке чистоће и учесталост контроле опреме, уређаја, прибора, радних површина, радне одјеће и руку радника у производњи и промету у објектима и превозним средствима која долазе у контакт с храном, у којима постоји ризик од појаве и ширења заразне болести (АБХ, 2013; Пропис, 2018; Пропис, 2019).

Циљ истраживања је да се процијени стање микробиолошке чистоће у ланцу хране.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Узорци брисева опреме, уређаја, прибора, радних површина, радне одјеће и руку радника у производњи, преради и промету у објектима и превозним средствима који долазе у контакт с храном, гдје постоји опасност од појаве и ширења заразне болести, коришћени су за испитивање. Узорци потичу из објеката за производњу, прераду и дистрибуцију хране, ресторана и других угоститељских објеката у којима се служи храна, објеката у области васпитања, образовања и социјалне заштите (објекти за смјештај лица) и превозних средстава која долазе у контакт с храном. Испитивање је обављено током 2020. године и обухватило је 2.958 узорака.

Узимање и транспорт узорака вршено је према BAS ISO 18593 (ИСБИХ, 2008). Оцјењивање усаглашености узорака у односу на број аеробних микроорганизама на 30°C и *Enterobacteriaceae* (Пропис, 2012; АБХ, 2013; Пропис 2018), *Salmonella* spp. (Пропис, 2019) и *Listeria monocytogenes* (Пропис, 2012; Пропис 2019), извршено је на основу категорија испитаних узорака и микробиолошких критеријума приказаних у Табели 1.

Табела 1 Категорије узорака и критеријуми микробиолошке чистоће

Категорија узорака	Број аеробних микроорганизама на 30°C	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Порцуланске, стаклене, глатке металне површине cfu/cm ²	≤ 10	0 - 1	Одсуство у 100cm ² /брису	Одсуство у 100cm ² /брису
Остале површине (дрвене, пластичне, камене) cfu/cm ²	≤ 30	0 - 1	Одсуство у 100cm ² /брису	Одсуство у 100cm ² /брису
Тањири, здјелице, прибор за јело и мање посуђе; посуђе и прибор који долазе у контакт са храном cfu/ml (cm ²)	≤ 100	0 - 1	Одсуство у 100cm ² /брису	Одсуство у 100cm ² /брису
Руке особа у додиру са храном cfu/ml (cm ²)	≤ 200	0 - 1	Одсуство у 100cm ² /брису	Одсуство у 100cm ² /брису
Боце или амбалажа за течне производе cfu/ml	0 - 1	0 - 1	Одсуство у брису	Одсуство у брису

cfu: colony forming units (јединица која формира колонију)

Лабораторијско испитивање узорака брисева вршено је следећим методама:

- детекција *Salmonella* spp. према BAS EN ISO 6579-1 (ИСБИХ, 2018а),
- детекција *Listeria monocytogenes* према BAS EN ISO 11290-1 (ИСБИХ, 2018б),

- број аеробних микроорганизама на 30°C према BAS EN ISO 4833-1 (ИСБИХ, 2006),
- број *Enterobacteriaceae* према BAS EN ISO 21528-2 (ИСБИХ, 2018в).

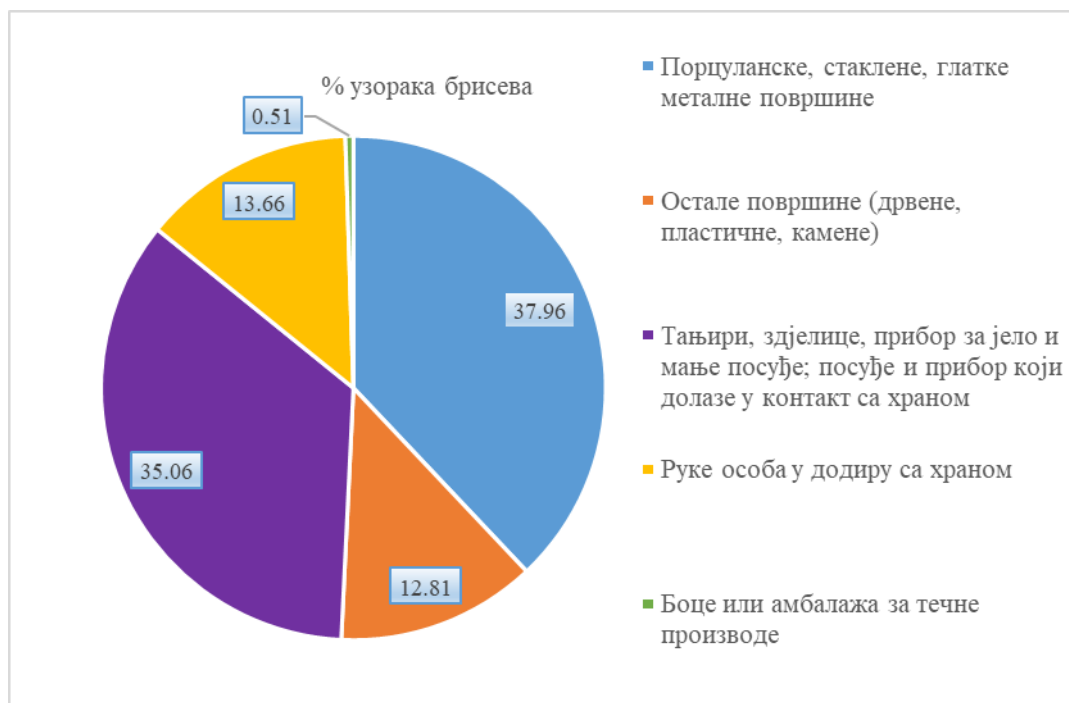
У нашем истраживању и у статистичкој анализи добијених резултата користили смо, као основне статистичке методе, дескриптивне статистичке параметре. Резултати истраживања приказани су табеларно и графички.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Један од главних ризика контаминације хране потиче из радног процеса особља које рукује храном и микроорганизама, узрочника болести, који су присутни у или на особљу, који се затим преносе с особља на храну током процеса руковања (Gordon-Davis, 1998).

Уобичајено је да се хигијенске провере у објектима усмеравају на површине које су најчешће у контакту са храном (Watnick и Kolter, 2000).

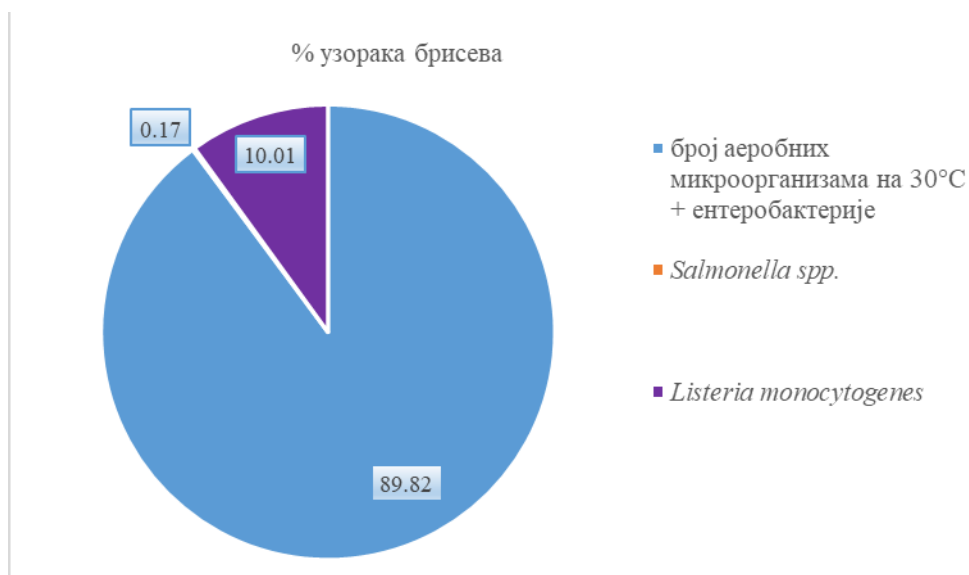
Структура испитаних узорака брисева по категоријама приказана је на Слици 1.



Слика 1 Узорци брисева по категоријама

Структура испитаних узорака у односу на категорију била је слична као у студији Golić et al. (2019). Занемарљиво мали број узорака брисева односи се на категорију „боце или амбалажа за течне производе“ из разлога што веома мали број субјеката у пословању храном обухваћених овим истраживањем, користи боце или амбалажу за течне производе у производњи хране. Због тога, резултати испитивања ових узорака су приказани, али нису узети у обзир за дискусију, јер сматрамо да број узорака није репрезентативан у односу на укупан број узорака обухваћених истраживањем.

Структура испитаних узорака брисева у односу на параметар испитивања приказана је на Слици 2.



Слика 2 Узорци брисева по параметру испитивања

Структура испитаних узорака у односу на параметар испитивања била је слична као у студији Golić et al. (2019) за број аеробних микроорганизама на 30°C, ентеробактерије и *Salmonella* spp. Број узорака испитаних на присуство *Listeria monocytogenes* је већи скоро за дупло, јер је овим истраживањем био обухваћен значајан број субјеката у пословању готовом храном.

На Слици 3 приказана је динамика узорковања односно испитивања узорака брисева по мјесецима.



Слика 3 Динамика испитивања узорка брисева по мјесецима

Узорци су узимани током свих дванаест мјесеци 2020. године, а динамика је зависила од доступности субјеката у пословању храном.

Упоредивањем добијених резултата испитивања са критеријумима микробиолошке чистоће, оцјењује се прихватљивост микробиолошке чистоће узорка. Узорак је прихватљиве микробиолошке чистоће ако испуњава микробиолошке критеријуме. Уколико садржи до 50% више микроорганизама, узорак може бити прихватљиве микробиолошке чистоће, под условом да не садржи патогене бактерије (Пропис, 2018; Пропис, 2019).

Од укупног броја испитаних узорка брисева, 94,22% је било задовољавајуће, а 5,78% је било незадовољавајуће. Од незадовољавајућих узорка, 77,19% је због повећаног броја аеробних микроорганизама на 30°C, а 22,81% због повећаног броја *Enterobacteriaceae*. Посматрано у односу на укупан број испитаних узорка, 4,46% узорка незадовољавајуће је због повећаног броја аеробних микроорганизама на 30°C, а 1,32% због повећаног броја ентеробактерија.

Појава болести преносивих храном у 81% случајева последица је контаминације хране у току чије производње нису поштовани принципи добре произвођачке праксе (Rašeta et al., 2012). Одсуство *Listeria monocytogenes* указује на ефикасан програм чишћења, прања и дезинфекције (Samelis и Metaxopoulos, 1999). У нашем истраживању патогени *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* нису изоловани ни у једном узорку бриса. Ови резултати су у

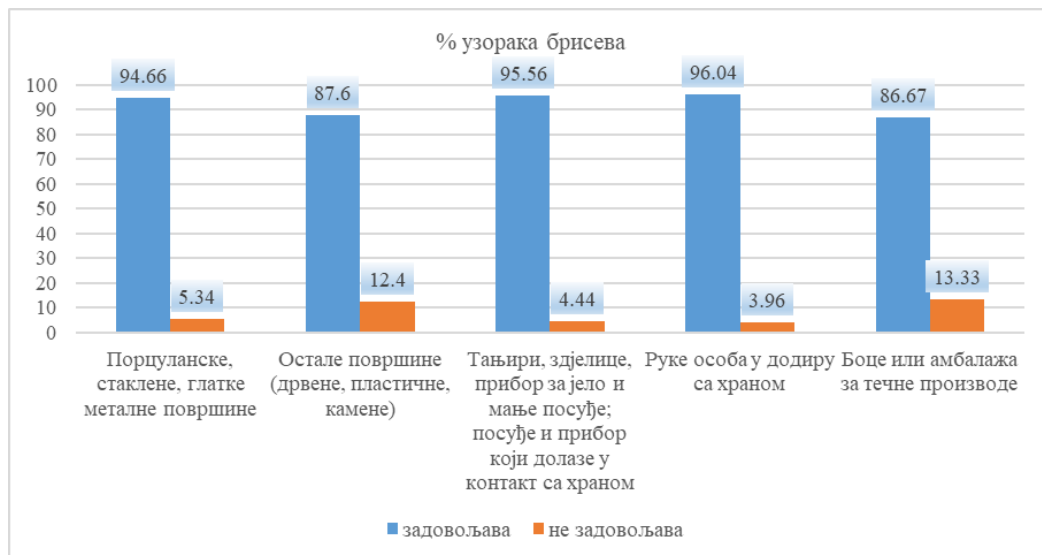
складу с резултатима које су добили Kalaba et al. (2017) и Golić et al. (2019). Учешће незадовољавајућих узорака брисева по категоријама приказано је на Слици 4.



Слика 4 Учешће незадовољавајућих узорака брисева по категоријама

Највише незадовољавајућих узорака било је из категорија „порцуланске, стаклене, глатке металне површине“ и „руке особа у додиру са храном“, што је у складу с истраживањем Golić et al. (2019). Ово указује да велики ризик представља хигијена особа које долазе у контакт с храном, што је у складу са закључцима Gordon-Davis (1998).

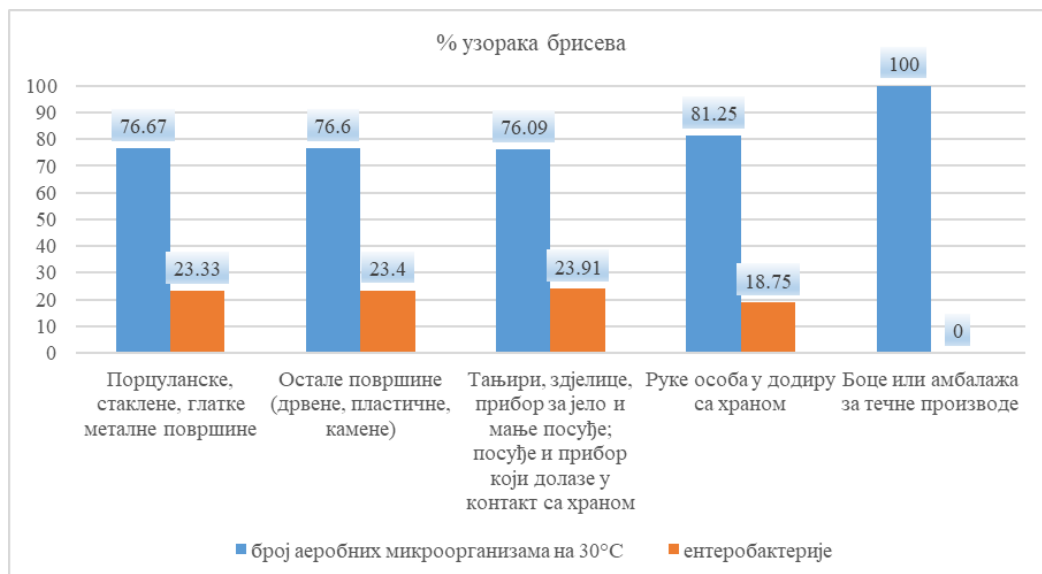
На Слици 5 приказани су резултати испитивања узорака брисева по категоријама.



Слика 5 Резултати испитивања узорака брисева по категоријама

Резултати испитивања за категорију „руке особа у додиру са храном“ у складу су с резултатима до којих су дошли Ivanović et al. (2013) и за ову категорију значајно су повољнији у односу на резултате Golić et al. (2019) и Kalaba et al. (2017). За категорије „таџири, здјелице, прибор за јело и мање посуђе; посуђе и прибор који долазе у контакт са храном“ и „порцуланске, стаклене, глатке металне површине“ резултати су у складу с резултатима Golić et al. (2019), док је значајно већи проценат незадовољавајућих узорака из категорије „остале површине (дрвене, пластичне, камене)“, претпостављамо због специфичности ових површина, које се теже чисте и одржавају.

На Слици 6 приказани су резултати незадовољавајућих узорака брисева по категоријама у односу на испитивани параметар.



Слика 6 Резултати незадовољавајућих узорака брисева по категоријама у односу на испитивани параметар

Када се посматрају резултати незадовољавајућих узорака брисева по категоријама у односу на испитивани параметар, уочава се да је већина узорака била незадовољавајућа због повећаног броја аеробних микроорганизама на 30°C, док је значајно мање незадовољавајућих узорака било због повећаног броја ентеробактерија, што је у складу с резултатима Golić et al. (2019). Међутим, потпуно супротно од наведеног истраживања, утврдили смо да је категорија „руке особа у додиру са храном“ имала највише незадовољавајућих узорака због повећаног броја аеробних микроорганизама на 30°C (81,25%), али и најмање незадовољавајућих узорака због повећаног броја ентеробактерија (18,75%), што је повољна околност јер се присуство ентеробактерија у узорцима брисева смањило, а патогене бактерије, од којих су неке и ентеробактерије, уопште нису утврђене.

ЗАКЉУЧАК

Добијени резултати указују да је општи ниво хигијене у производњи и дистрибуцији хране на високом нивоу, посебно због одсуства патогена *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*, али да и даље постоји ризик од контаминације *Enterobacteriaceae*, које су индикатори хигијене процеса

производње. Свакако, највећи ризик је од сапрофитских бактерија, које могу значајно утицати на микробиолошке, физичко-хемијске и сензорне карактеристике финалног производа у ланцу хране. Због овога треба константно одржавати висок ниво свијести особља у погледу хигијене, те спроводити редовне мјере, обуке и провјере знања из области хигијенског минимума. Такође, процес континуиране самоконтроле значајно утиче на висок ниво микробиолошке чистоће у ланцу хране.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Aarnisalo K., Tallavaara K., Wirtanen G., Maijala R., Raaska L. (2006): The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food control*, 17:1001-1011.
- АБХ (2013): Водич за микробиолошке критеријуме за храну. Агенција за безбједност хране Босне и Херцеговине.
- Adams M. R., Moss M. O. (1997): Food microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- Aguado V., Vitas A.I., Garcia-Jalon I. (2001): Random ampliWed polymorphic DNA typing applied to the study of cross contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. *Journal of Food Protection*, 64(5):716-720.
- Fonnesbech-Vogel B., Jørgensen L. V., Ojeniyi B., Huss H. H., Gram L. (2001): Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random ampliWed polymorphic DNA analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2):83-92.
- Gill C. O., Jones T. (1999): The microbiological effects of breaking operations on hanging beef carcass sides. *Food Research International*, 32:453-459.
- Golić B., Ilić T., Kalaba V., Golić M., Delić S. (2019): Microbiological purity testing in food production and marketing. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, 19(1):64-75.
- Gordon-Davis L. (1998): The hospitality industry handbook on hygiene and safety: for South African students and practitioners. Juta and Copmany (Pty) Ltd.
- ИСБИХ (2014): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за бројање микроорганизама – Дио 1: Бројање колонија при 30°C техником излијевања подлоге. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 4833-1.
-

- ИСБИХ (2008): Микробиологија хране и хране за животиње – Хоризонтална метода за технике узорковања са површине користећи контактне плоче и брисеве. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS ISO 18593.
- ИСБИХ (2018а): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за детекцију и серотипизацију *Salmonella* spp. – Дио 1: Детекција. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 6579-1.
- ИСБИХ (2018б): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за детекцију и бројање *Listeria monocytogenes*, Dio 1: Детекција. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 11290-1.
- ИСБИХ (2018в): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за детекцију и бројање *Enterobacteriaceae* – Дио 2: Техника бројања колонија. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 21528-2.
- Ivanović J., Baltić Ž. M., Karabasil N., Dimitrijević M., Antić N., Janjić J., Đorđević J. (2013): Investigation of the microbiological contamination of contact surfaces in meat processing facilities. *Meat technology*, 54(2):110-116.
- Johns N. (1991): Managing food hygiene. The Macmillan Press Ltd.
- Kalaba V., Golić B., Kalaba D., Marjanović Balaban Ž. (2017): Investigation of the Microbiological contamination of contact surface with food. In the V International Congress „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“, 164-173.
- Lawrie R. A. (1998): Lawrie's meat science (6th ed.). Woodhead Publishing Limited.
- Lundén J. M., Autio T. J., Korkeala H. J. (2002): Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65(7):1129-1133.
- Lundén J. M., Autio T. J., Sjöberg A. M., Korkeala H. J. (2003): Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 66(11):2062-2069.
- Пропис (2004): Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council: EU: Official Journal of the European Union, L139/1, 39-54.
- Пропис (2012): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну. Службени гласник Републике Српске, 109/12.
- Пропис (2018): Правилник о поступку утврђивања критеријума микробиолошке чистоће. Службени гласник Републике Српске, 74/18.
- Пропис (2019): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну животињског поријекла. Службени гласник Републике Српске, 69/19.
-

- Rašeta M., Matekalo Sverak V., Đorđević V., Vranić V., Branković Lazić I., Grbić Z., Grubić M., Lončina J. (2012): The hand hygiene of workers from the aspect of the process hygiene in retail sale of food. In the Biological Food Safety and Quality BFSQ, 171-174.
- Samelis J., Metaxopoulos J. (1999): Incidence and principle sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology* 16:465-477.
- Suihko M. L., Salo S., Niclasen O., Gudbjörnsdóttir B., Torkelsson G., Bredholt S. (2002): Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from th meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2): 137-146.
- Watnick P., Kolter R. (2000): Minireview: Biofilm, city of microbs. *Journal Bacteriology*, 182:2675-7679.

Рад примљен: 16.05.2023.

Рад прихваћен: 21.07.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301143G

UDK 539.16:579.67

Original Scientific Paper

MICROBIOLOGICAL PURITY IN FOOD CHAIN

Bojan GOLIĆ^{1*}, Drago N. NEDIĆ², Dragan KASAGIĆ¹, Amela JAMAKOVIĆ³

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

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

³Veterinary Institute of the Tuzla Kanton, Tuzla, Bosnia and Herzegovina

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

Summary

In addition to microbiological criteria for food (food safety criteria and hygiene criteria in the production process), microbiological purity criteria are a very important link in the microbiology of the food chain. Swab samples of equipment, devices, accessories, work surfaces, work clothes and hands of workers engaged in production, processing and traffic in facilities and vehicles that come into contact with food, and where there is a risk of the appearance and spread of an infectious disease, were used for testing. The examined samples originated from facilities for the production, processing and distribution of food, restaurants and other catering facilities where food is served, educational and social protection facilities (accommodation facilities) and vehicles that come into contact with food. The study was carried out during year 2020 and included 2,958 samples. Laboratory analysis of swab samples was performed using BAS EN ISO 4833-1:2014, BAS EN ISO 21528-2:2018, BAS EN ISO 11290-1:2018 and BAS EN ISO 6579-1:2018 methods. The aim of the study is to assess the microbiological purity in the food chain. Of the total number of analyzed swab samples, 94.22% were satisfactory, and 5.78% were unsatisfactory. Observed in relation to the total number of analyzed samples, 77.19% of the samples were unsatisfactory due to the increased number of aerobic microorganisms at 30°C, and 22.81% due to the increased number of *Enterobacteriaceae*. Pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not isolated in any swab sample. The obtained results indicate that the general level of hygiene in the production and distribution of food is at a high level, especially due

to the absence of pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, but that there is still a risk of contamination by *Enterobacteriaceae*, which are indicators of the hygiene of the production process.

Key words: microbiological purity, food chain, number of microorganisms, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*

INTRODUCTION

In addition to microbiological criteria for food (food safety criteria and hygiene criteria in the production process), microbiological purity criteria are a very important link in the microbiology of the food chain. Food handling areas, vehicles, items, utensils and equipment that come into contact with food must be regularly maintained (mechanical cleaning and washing) and disinfected to avoid any risk of contamination, while food and personnel must be constantly monitored (Rulebook, 2004). Food handlers must maintain a high level of personal hygiene and wear appropriate protective clothing, and be trained in food hygiene requirements (Gill and Jones, 1999).

Improper cleaning and disinfection are directly related to the occurrence of various foodborne diseases (Johns, 1991). Training of food handling personnel about basic concept and requirements of personal hygiene is an integral part of measures to obtain a safe product for the consumer (Adams and Moss, 1997).

In the microbiological examination of swabs, the assessment of surface hygiene is mainly based on the determination of the number of aerobic microorganisms at 30°C and *Enterobacteriaceae* per cm² (Aarnisalo et al., 2006). In addition to these, analysis is sometimes performed for the presence of other microorganisms, as it has been proven that *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and faecal streptococci originate from infected persons who handle food (Lawrie, 1998).

Surfaces that come into contact with ready-to-eat food should be analyzed for the presence of *Listeria monocytogenes* as the cause of listeriosis, a serious infectious disease of humans and animals (Aguado et al., 2001; Lundén et al., 2002; Lundén et al., 2003; Suihko et al., 2002; Fonnesbech-Vogel et al., 2001). Study done by Samelis and Metaxopoulos (1999) indicates that, in the food production process, the environment is a more common source of *Listeria monocytogenes* than live animals and carcasses, so special attention should be paid to the cleaning and disinfection process.

Due to the risk to public health, mandatory tests for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and for *Salmonella* spp. in meat, semi-finished products and meat products are conducted in production, processing and trade (Rulebook, 2012; Rulebook, 2019)

The current regulation defines the criteria of microbiological purity and the frequency of control of equipment, devices, accessories, work surfaces, work clothes and hands of workers in production and traffic in facilities and vehicles that come into contact with food, in which there is a risk of the appearance and spread of an infectious disease (FSA, 2013; Rulebook, 2018; Rulebook, 2019).

The aim of the study is to assess the state of microbiological cleanliness in the food chain.

MATERIALS AND METHODS

Swabs samples of equipment, devices, accessories, work surfaces, work clothes and hands of workers in production, processing and traffic in facilities and vehicles that come into contact with food, where there is a risk of the appearance and spread of an infectious disease, were used for analysis. The samples originated from facilities for the production, processing and distribution of food, restaurants and other catering facilities where food is served, educational and social protection facilities (accommodation facilities) and vehicles that come into contact with food. The study was carried out during year 2020 and included 2,958 samples.

Sample collection and transport was performed according to BAS ISO 18593 (ISBIH, 2008).

The assessment of the samples in relation to the number of aerobic microorganisms at 30°C and *Enterobacteriaceae* (Rulebook, 2012; FSA, 2013; Rulebook, 2018), *Salmonella* spp. (Rulebook, 2019) and *Listeria monocytogenes* (Rulebook, 2012; Rulebook, 2019) was performed based on the categories of analyzed samples and microbiological criteria as shown in Table 1.

Table 1 Categories of samples and microbiological purity criteria

Category of samples	Number of aerobic microorganisms at 30°C	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Porcelain, glass, smooth metal surfaces cfu/cm ²	≤ 10	0 - 1	Absence in 100cm ² /swab	Absence in 100cm ² /swab
Other surfaces (wooden, plastic, stone) cfu/cm ²	≤ 30	0 - 1	Absence in 100cm ² /swab	Absence in 100cm ² /swab
Plates, bowls, cutlery and smaller dishes; dishes and utensils that come into contact with food cfu/ml (cm ²)	≤ 100	0 - 1	Absence in 100cm ² /swab	Absence in 100cm ² /swab
Hands of persons in contact with food cfu/ml (cm ²)	≤ 200	0 - 1	Absence in 100cm ² /swab	Absence in 100cm ² /swab
Bottles or packaging for liquid products cfu/ml	0 - 1	0 - 1	Absence in the swab	Absence in the swab

cfu: colony forming units

Laboratory analysis of swab samples was performed using the following methods:

- detection of *Salmonella* spp. according to BAS EN ISO 6579-1 (ISBIH, 2018a),
- detection of *Listeria monocytogenes* according to BAS EN ISO 11290-1 (ISBIH, 2018b),
- the number of aerobic microorganisms at 30°C according to BAS EN ISO 4833-1 (ISBIH, 2006),

- number of *Enterobacteriaceae* according to BAS EN ISO 21528-2 (ISBIH, 2018c).

In the statistical analysis of the results obtained in our study descriptive statistical parameters were used. The results of the study are presented in tables and graphs.

RESULTS AND DISCUSION

One of the main risks of food contamination originate from the work process of food handlers and microorganisms, pathogens, that are present in or on the staff, which are then transferred from the staff to the food during the handling process (Gordon-Davis, 1998).

It is common that the facilities hygiene control is obtained on surfaces that are most often in contact with food (Watnick and Kolter, 2000).

The structure of the analyzed swab samples by category is shown in Figure 1.

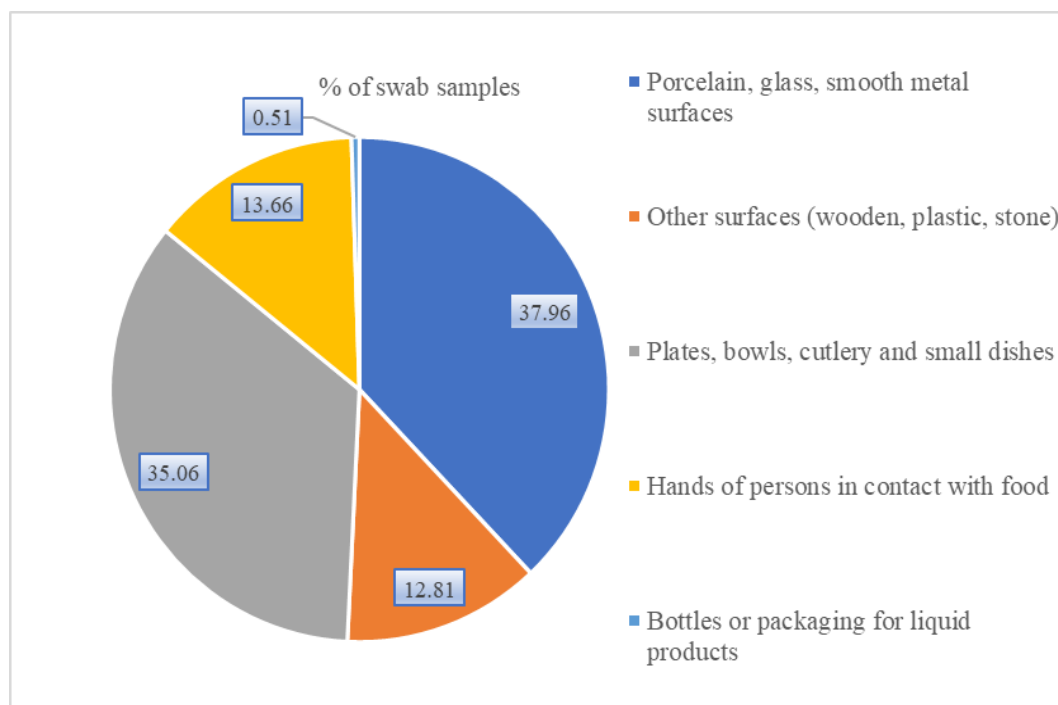


Figure 1 Swab samples by category

The structure of the analyzed samples in relation to the category was similar to the study done by Golić et al. (2019). A negligibly small number of swab samples refers

to the category “bottles or packaging for liquid products” due to the fact that very few subjects in the food business included in this study use bottles or packaging for liquid products in food production. Therefore, the test results of these samples are presented, but not taken into account for the discussion, because we believe that the number of samples is not representative in relation to the total number of samples included in the study.

The structure of the analyzed swab samples in relation to the test parameter is shown in Figure 2.

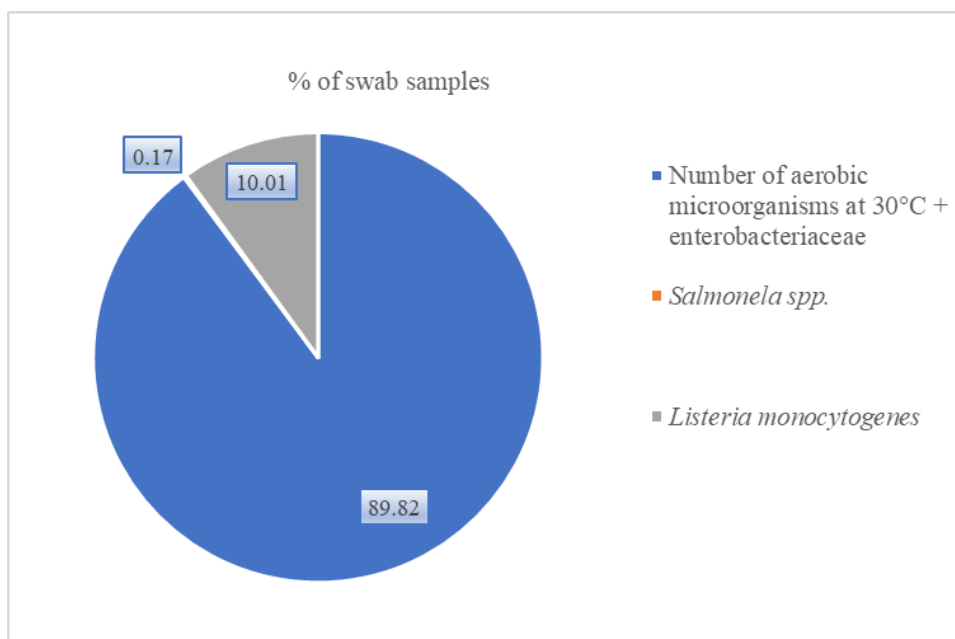


Figure 2 Swab samples according to the test parameter

The structure of the analyzed samples according to the test parameter was similar to the study by Golić et al. (2019) for the number of aerobic microorganisms at 30°C, enterobacteria and *Salmonella* spp. The number of samples analyzed for the presence of *Listeria monocytogenes* is almost double, because this study included a significant number of subjects in the ready-to-eat food business.

Figure 3 shows the dynamics of sampling, i.e. examination of swab samples by month.

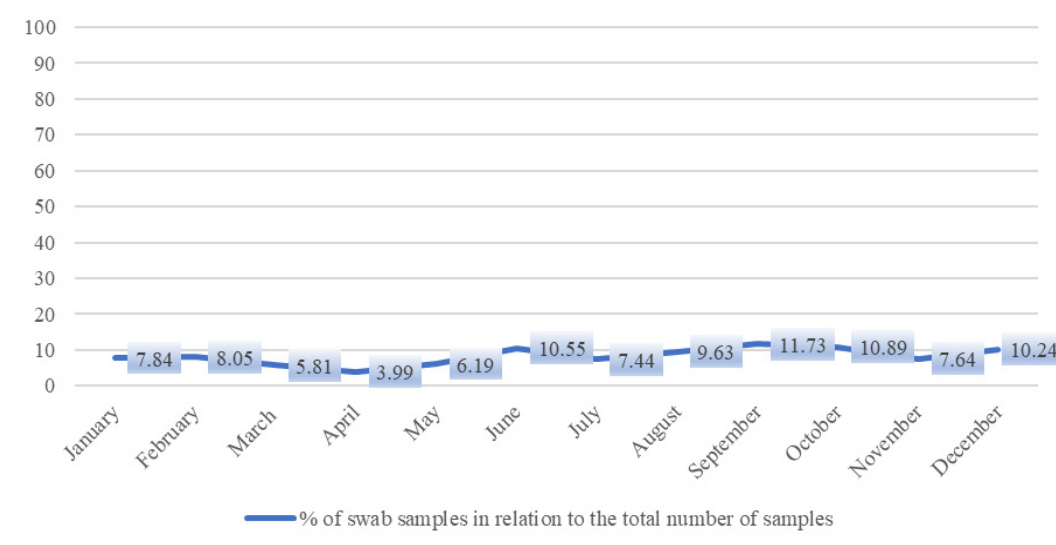


Figure 3 Dynamics of examination of swab samples by month

The samples were taken during all twelve months of year 2020, and the dynamics depended on the availability of subjects in the food business.

By comparing the obtained results with the microbiological purity criteria, the acceptability of the microbiological purity of the sample is evaluated. A sample is of acceptable microbiological purity if it meets the microbiological criteria. If it contains up to 50% more microorganisms, the sample can be of acceptable microbiological purity if it does not contain pathogenic bacteria (Rulebook, 2018; Rulebook, 2019)

Of the total number of tested swab samples, 94.22% were satisfactory, and 5.78% were unsatisfactory. Of the unsatisfactory samples, 77.19% are due to an increased number of aerobic microorganisms at 30°C, and 22.81% are due to an increased number of *Enterobacteriaceae*. Observed in relation to the total number of analyzed samples, 4.46% of the samples were unsatisfactory due to an increased number of aerobic microorganisms at 30°C, and 1.32% due to an increased number of enterobacteria.

In 81% of cases, the occurrence of food-borne diseases is the result of food contamination during the production of which the principles of good production practice were not respected (Rašeta et al., 2012). The absence of *Listeria monocytogenes* indicates an efficient cleaning, washing and disinfection program (Samelis and Metaxopoulos, 1999). In our study, the pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not isolated in any swab sample. These results are

consistent with the results obtained by Kalaba et al. (2017) and Golić et al. (2019). The share of unsatisfactory swab samples by category is shown in Figure 4.

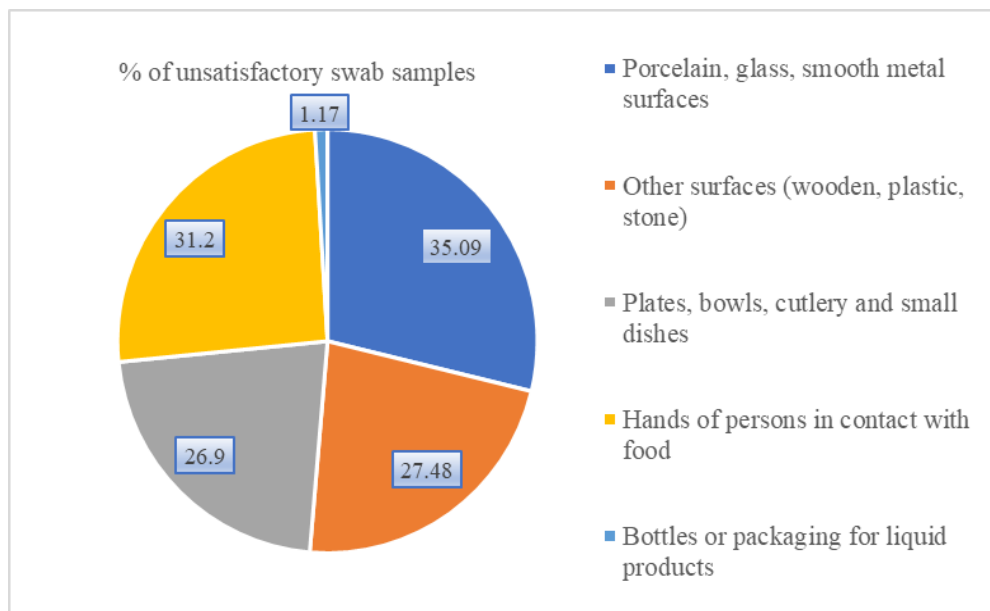


Figure 4 The share of unsatisfactory swab samples by category

The most unsatisfactory samples were from the categories “porcelain, glass, smooth metal surfaces” and “hands of persons in contact with food”, which is in accordance with the study done by Golić et al. (2019). This indicates that the hygiene of persons who come into contact with food is a major risk, which is in line with the conclusions of Gordon-Davis (1998).

Figure 5 shows the test results of swab samples by category.

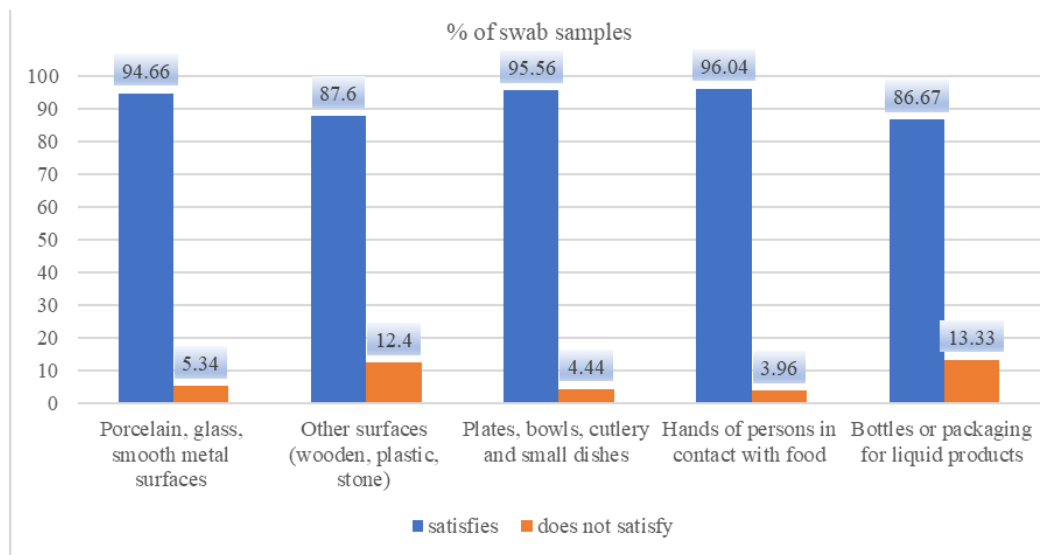


Figure 5 Results of swab samples by category

The obtained results for the category “hands of persons in contact with food” are in accordance with the results obtained by Ivanović et al. (2013) and for this category are significantly more favorable than the results of Golić et al. (2019) and Kalaba et al. (2017). For the categories “plates, bowls, cutlery and small dishes; dishes and utensils that come into contact with food” and “porcelain, glass, smooth metal surfaces” the results are in accordance with the results of Golić et al. (2019), while the percentage of unsatisfactory samples from the “other surfaces (wooden, plastic, stone)” category is significantly higher, probaly due to the specificity of these surfaces, which are more difficult to clean and maintain.

Figure 6 shows the results of unsatisfactory swab samples by category according to the tested parameter.

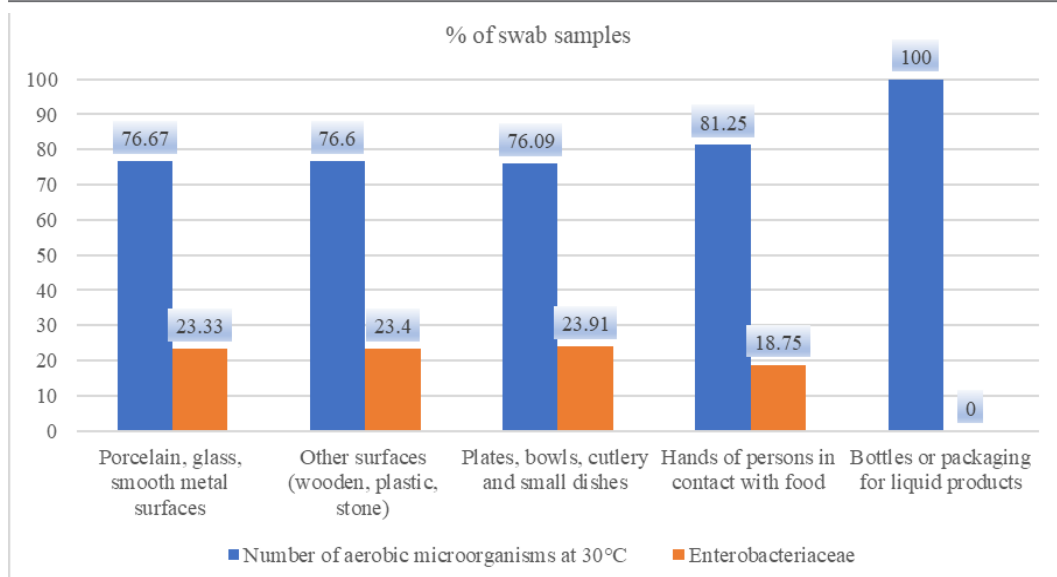


Figure 6 Results of unsatisfactory swab samples by category according to the tested parameter

When analyzing the results of unsatisfactory swab samples by category in accordance to the tested parameter, it is observed that most samples were unsatisfactory due to an increased number of aerobic microorganisms at 30°C, while significantly fewer unsatisfactory samples were due to an increased number of enterobacteria, which is in accordance with the results of Golić et al. (2019). However, completely contrary to the mentioned study, we found that the category “hands of people in contact with food” had the most unsatisfactory samples due to the increased number of aerobic microorganisms at 30°C (81.25%), but also the least unsatisfactory samples due to the increased number of enterobacteria (18.75%), which is a favorable circumstance because the presence of enterobacteria in swab samples decreased, and pathogenic bacteria, some of which are enterobacteria, were not detected at all.

CONCLUSION

The obtained results indicate that the general level of hygiene in the production and distribution of food is at a high level, especially due to the absence of pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, but that there is still a risk of contamination by *Enterobacteriaceae*, which are indicators of the hygiene of the production process. Certainly, the greatest risk is from saprophytic bacteria,

which can significantly affect the microbiological, physical-chemical and sensory characteristics of the final product in the food chain. Because of this, it is necessary to constantly maintain a high level of awareness of the staff in terms of hygiene, and to implement regular measures, to carry out staff training and testing in the field of minimum hygiene. Also, the process of continuous self-control significantly affects the high level of microbiological purity in the food chain.

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

REFERENCES

- Aarnisalo K., Tallavaara K., Wirtanen G., Majjala R., Raaska L. (2006): The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food control*, 17:1001-1011.
- Adams M. R., Moss M. O. (1997): Food microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- Aguado V., Vitas A.I., Garcia-Jalon I. (2001): Random ampliWed polymorphic DNA typing applied to the study of cross contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. *Journal of Food Protection*, 64(5):716-720.
- Fonnesbech-Vogel B., Jørgensen L. V., Ojeniyi B., Huss H. H., Gram L. (2001): Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random ampliWed polymorphic DNA analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2):83-92.
- FSA (2013): Microbiological criteria for foodstuffs Mostar, Bosnia and Herzegovina: Food Safety Agency of Bosnia and Herzegovina.
- Gill C. O., Jones T. (1999): The microbiological effects of breaking operations on hanging beef carcass sides. *Food Research International*, 32:453-459.
- Golić B., Ilić T., Kalaba V., Golić M., Delić S. (2019): Microbiological purity testing in food production and marketing. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, 19(1):64-75.
- Gordon-Davis L. (1998): The hospitality industry handbook on hygiene and safety: for South African students and practitioners. Juta and Copmany (Pty) Ltd.
- ISBIH (2014): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony enumeration at 30°C by the pour plate technique and pouring technique. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 4833-1.
-

- ISBIH (2008): Microbiology of the foodstuff and feedstuff – Horizontal method for surface sampling using contact plates and swabs. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS ISO 18593.
- ISBIH (2018a): Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and serotyping of *Salmonella* spp. – Part 1: Detection. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 6579-1.
- ISBIH (2018b): Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, Part 1: Detection. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 11290-1.
- ISBIH (2018c): Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count technique. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 21528-2.
- Ivanović J., Baltić Ž. M., Karabasil N., Dimitrijević M., Antić N., Janjić J., Đorđević J. (2013): Investigation of the microbiological contamination of contact surfaces in meat processing facilities. *Meat technology*, 54(2):110-116.
- Johns N. (1991): Managing food hygiene. The Macmillan Press Ltd.
- Kalaba V., Golić B., Kalaba D., Marjanović Balaban Ž. (2017): Investigation of the Microbiological contamination of contact surface with food. In the V International Congress „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“, 164-173.
- Lawrie R. A. (1998): Lawrie's meat science (6th ed.). Woodhead Publishing Limited.
- Lundén J. M., Autio T. J., Korkeala H. J. (2002): Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65(7):1129-1133.
- Lundén J. M., Autio T. J., Sjöberg A. M., Korkeala H. J. (2003): Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 66(11):2062-2069.
- Rašeta M., Matekalo Sverak V., Đorđević V., Vranić V., Branković Lazić I., Grbić Z., Grubić M., Lončina J. (2012): The hand hygiene of workers from the aspect of the process hygiene in retail sale of food. In the Biological Food Safety and Quality BFSQ, 171-174.
- Rulebook (2004): Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council: EU: Official Journal of the European Union, L139/1, 39-54.
- Rulebook (2012). Rulebook on Microbiological Criteria for Foodstuffs. The Official Gazette of Republic of Srpska, 109/12.
-

- Rulebook (2018). The Rulebook on Microbiological Purity Criteria. The Official Gazette of Republic of Srpska, 74/18.
- Rulebook (2019). Rulebook on Microbiological Criteria for Food of Anima Origin. The Official Gazette of Republic of Srpska, 69/19.
- Samelis J., Metaxopoulos J. (1999): Incidence and principle sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology* 16:465-477.
- Suihko M. L., Salo S., Niclasen O., Gudbjörnsdóttir B., Torkelsson G., Bredholt S. (2002): Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from th meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2): 137-146.
- Watnick P., Kolter R. (2000): Minireview: Biofilm, city of microbs. *Journal Bacteriology*, 182:2675-7679.

Paper received: 16.05.2023.

Paper accepted: 21.07.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301156V

UDK 616.993:619(497-12)

Прегледни научни рад

ВЕКТОРСКЕ ЗООНОЗЕ КОЈЕ МОГУ ДА УГРОЗЕ РЕГИОН
ЈУГОИСТОЧНЕ ЕВРОПЕМирослав ВАЛЧИЋ^{1*}, Ана ВАСИЋ², Драго НЕДИЋ¹¹Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија²Научни институт за ветеринарство Србије, Београд, Србија* Коресподентни аутор: Мирослав Валчић, miroslaval@mail.com

Сажетак

Први Факултет ветеринарске медицине основан је у Француској (Лион) 1762. године, у намери да се спрече циклични таласи појављивања куге говеда почетком 18. века у Европи. Три века касније сведоци смо да инфективне болести и у оквиру њих зоонозе, не само да не могу да се искорене у регионима где се појављују ензоотски већ и да њихово ширење представља реалну претњу и за удаљене регионе света. Посебан сегмент науке о заразним болестима чини група зооноза које се преносе векторима. Ради се о бројним инфективним болестима животиња и људи, чији се узрочници преносе инсектима и артроподама при чему се у неким случајевима, вектори појављују као прави домаћини и резервоари изазивача зооноза. До пре две деценије појава грознице Западног Нила (*West Nile fever*) у регионима света где се ова зооноза појављивала ензоотски и ендемски (на пример Афрички континент), није заокупљала пажњу епизоотиолога и епидемиолога. Међутим, ова заразна болест је у протеклих двадесетак година у нашем региону изазвала обољевање значајног броја људи, а у неким случајевима исход је био фаталан. Аналогно примеру грознице Западног Нила, може да се претпостави да већи број зооноза које се преносе векторима, практично „куца на врата“ региона југоисточне Европе. Тај регион може да се сматра пуфер зоном где са стране југа и истока постоје мање или више удаљени региони где се ензоотски појављују до сада „егзотичне“ зоонозе и из ког правца може да се очекује продор вектора, а са њима и изазивача инфективних обољења које преносе. Потенцијал трансмисије векторских зооноза се пре свега односи на обољења која преносе инсекти и артропode. У случају инсеката могао би да се очекује нагли продор на пример, грознице Рифтске долине (*Rift valley fever*), инфекције

Chikungunya вирусом (*Chikungunya*), јапанског енцефалитиса (*Japanese encephalitis*) или жуте грознице (*Yellow fever*). Борба са оваквим зоонозама пре свега треба да се заснива на контроли вектора. За неке од ових зооноза већ постоје развијене вакцине за употребу у хуманој (на пример Јапански енцефалитис) и ветеринарској (на пример грозница Западног Нила) медицини. У случају да се ради о зоонозама које се преносе артроподама (Конго-Кримска хеморагична грозница, крпељски енцефалитис), очекује се да се зараза шири полако али стабилно, при чему већи значај имају дијагностичка испитивања и примена метода присмотре и надзора присуства у врстама животиња које могу да буду индикатори присуства обољења. У раду су приказани основни механизми у трансмисији векторских зооноза као и поједине заразне болести које се преносе инсектима и артроподама, а које имају значајан потенцијал да угрозе регион југа и истока Европе.

Кључне ријечи: Епизоотиологија, векторске заразе, арбовируси.

УВОД

У епизоотиолошком (епидемиолошком) смислу под векторима у ширем смислу појма, подразумевају се живи преносиоци заразних болести у популацијама пријемчивих врста кичмењака. Међутим, од већег значаја је дефиниција вектора у ужем смислу која се односи на инсекте и артропode као преносиоце вируса, бактерија и протозоа. Најчешће се ради о инсектима реда *Diptera* који обухвата комарце (*Culicidae*), пешчане мушице (*Psychodidae*) и хематофагне мушице (*Ceratopogonidae*). У неким случајевима и црне мушице (*Simuliidae*) могу да служе као преносиоци обољења. Поред инсеката, као вектори у епизоотиолошком и епидемиолошком смислу, велики значај имају и акарине, поткласе *Acari*, класе *Arachnida* тј. крпељи. Велика већина заразних болести које се преносе векторима (векторске заразе), изазвана је вирусима који су, из разлога што се преносе артроподама, сврстани у тзв. Арбовирусну групу (Арбовируси: *Arthropod-borne viruses* (енгл)) (Tsai и Chandler, 2007). Ови вируси могу да се преносе вертикално, у популацијама вектора. Међутим, ипак у највећем броју случајева њихово одржавање у природи зависи од хоризонталне трансмисије између кичмењака, путем вектора. Отуда може да се каже да се арбовируси значајно разликују од осталих вируса чије одржавање у природи зависи само од директне трансмисије у популацији пријемчиве врсте.

Свакако не и коначан списак арбовируса чине преко 500 вируса од којих преко 100 може да инфицира човека, а преко 40 врста вируса изазивају инфекцију

животиња (Karabastos, 1985). Најзначајнији арбовируси који инфицирају људе и животиње спадају у РНК вирусе и то у фамилије: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* и *Rhabdoviridae*. Само један ДНК вирус спада у арбовирусе, а то је изазивач афричке куге свиња (*Asfarviridae*). Велика заступљеност РНК вируса у групи арбовируса објашњава се карактеристикама генетског материјала. Наиме, РНК геном значајно варира и способан је да се адаптира на различите репликативне услове и механизме који владају у домаћинима који су фило и онкогенетски веома удаљени као што су кичмењаци и вектори (Beaty и сар., 1988).

Арбовируси људи су класификовани према карактеристикама обољења: системска фебрилна обољења, енцефалитиси и хеморагичне грознице. У ветеринарској медицини, арбовируси изазивају обољења са више симптома и облика али се и у овом случају најчешће налазе енцефалитиси и хеморагични синдроми (Bres, 1988).

У односу на врсту вектора, може да се каже да већина арбовируса које преносе крпељи, изазивају енцефалитисе. Најзначајнији вируси ове категорије који изазивају епидемије и епизоотије, спадају у тогавирусе, алфавирусе, флавивирусе и бунјавирусе. Први вирус за кога је била доказана трансмисија путем вектора у 17. веку, био је изазивач жуте грознице. Ради се о обољењу које се и данас појављује (Јужна Америка и Африка) у форми спорадичне и сезонске епидемије упркос чињеници постојања ефикасних мера контроле вектора (комараца) и ефикасне атенуисане вакцине (Ludwig и Iacono-Connors, 1993). Денга, векторска зооноза која се по први пут спомиње 1907. године, и данас изазива обољење стотина хиљада људи у тропским пределима (Monah, 1994). Венецуелански енцефалитис коња изазива масовне енцефалитисе код коња и људи и то од двадесетих година прошлог века па све до данас (Rico-Hesse и сар., 1995), упркос постојању ефикасне вакцине за коње. Вирус реке Рос изазива епидемије артритиса заражавајући и до 68% популације људи на неким острвима Пацифичког региона (Walton и Grayson, 1988). У поређењу са алфавирусима и флавивирусима, већина бунјавируса изазивају благе заразне болести људи. Међутим, вирус изазивач грознице долине Рифта доводи до тешких обољења животиња и људи уз висок степен морталитета. Историјски подаци указују да се овај вирус појавио у Африци после 12 година „мировања“ изазивајући епизоотију и епидемију (Arthur и сар., 1993). Наведени подаци указују да ће се арбовируси и у будућности наставити да појављују као изазивачи векторских зооноза што свакако наглашава потребу даљег истраживања карактеристика обољења „*per se*“ али и механизма ових заразних болести уопште.

Циклуси инфекција изазваних арбовирусима

Ради се о циклусима захваљујући којима се арбовируси одржавају у природи, инфицирајући кичмењаке (домаћине) и векторе (хематофагне инсекте и артропode). Већином су вектори из групе комараца. Ређе су преносиоци крпељи (*Argas*) и пешчане мушице (*Phlebotomus* spp) при чему постоји тесна веза између изазивача (вируса) и вектора. Штавише, у неким случајевима сматра се да су вектори у ствари прави домаћини вирусима. Истовремено, различити вектори (комарци) могу да служе као вектори истог вируса различитих кичмењака у зависности од појединачних географских и еколошких ситуација. Најчешће се кичмењаци, нарочито људи појављују као „слепа улица“, у улози интермедијарних домаћина (Tsai и Chandler, 2007). На епизоотиологију (и епидемиологију) арбовирусних инфекција утичу бројни и често међусобно независни фактори као што су то број и имуни статус врсте тј. кичмењака (домаћина) која служи као резервоар датог арбовируса у природи, климатске прилике од којих зависи репродукција вектора. У комплексан циклус одржавања арбовируса у природи учествују различите врсте комараца са променљивим афинитетом према различитим врстама кичмењака на којима се хране уз често мењање домаћина. Сезонско повећање инциденције инфекција, зависи од услова репродукције вектора и њиховог преживљавања. У случају да се у до тада незаражени регион света са континенталном климом унесе нови арбовирус, поставља се питање преживљавања вектора током зиме али и могућност презимљавања нових локалних врста вектора на које дати вирус може да се адаптира.

Од кључног значаја за разумевање арбовирусних инфекција јесте познавање да ли се вектор у циклусу одржавања вируса, појављује и као резервоар тј. да ли се вирус преноси транс-стадијумски и трансваријално унутар популације вектора. На пример, *Bunyavirus*, директно зависи од експресије вирусних гена и метаболичких активности домаћина. Оброци вектора у виду капи крви активирају ћелијске гене у оваријуму вектора (женке комарца) што истовремено стимулише репликацију вируса. Истовремено, током периода дијапаузе (хибернација јаја) вектора, могуће је да се докаже експресија вирусних гена при чему се скоро целокупни механизам репликације користи за иРНК вируса. По окончању дијапаузе, механизми репликације ћелија се у потпуности користе за иРНК вируса (Dobie и сар., 1997). Овај јединствени начин експресије вируса и рекомбинације на интер и интрамолекуланом нивоу је нарочито значајан уколико су јаја вектора инфицирана са два различита бунја вируса. У том случају, механизмима рекомбинације и реасортирања, настају нове варијанте вируса.

У случају да се узрочник заразне болести преноси крпељима, потребно је да се подсетимо да период времена за развој у одраслог облика (од јаја преко ларве и нимфе) износи преко две године (у условима континенталне климе). У сваком од ових стадијума, вектору је потребан оброк у виду капи крви при чему се пренос арбовируса одиграва при сваком храњењу. Густина популације крпеља зависи не само од климатских фактора током дате сезоне већ и током претходних година. Некада, потпуно различити вируси користе исте циклусе за одржавање у природи који су заједнички за кичмењаке тј. резервоаре вируса и вектора. У том случају, као резултат може да се појави близак епизоотиолошки однос па тако на пример, изазивач западног енцефалитиса коња (алфавирус) и изазивач *St. Louis* енцефалитиса (флавивирус), шире се истим епизоотиолошким циклусом у коме су учесници дивље птице и комарци (*Culex tarsalis*). У природи, оба се обољења јављају симултано. Слична повезаност постоји у Африци и Азији и између Синдбис вируса (алфавирус) и вируса изазивача Западног Нила (флавивирус), при чему оба вируса користе епизоотиолошки циклус у коме су резервоари птице, а вектори инсекти (*Culex univittatus*). Урбани циклус жуте грознице, денга и *Chikungunya* грознице зависе од вектора комарца *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Исто тако, крпељ *Ixodes ricinus*, преноси вирус изазивач крпељског енцефалитиса али и узрочника Лајмске болести (*Borrelia burgdorferi*). Крпељ *Dermacentor marginatus* преноси Q грозницу (*Coxiella burnetii*) али и вирусе изазиваче источног и западног енцефалитиса (Porterfield, 1995). Истовремено присуство бактерија и вируса у истом вектору може да буде штетно за вирус али истовремено и да представља једну од метода контроле вектора. Установљено је да комарац *Aedes aegypti*, уколико је инфициран са интрацелуларном бактеријом (сој *wMel* изолован из *Drosophila melanogaster*), губи способност да пренеси узрочника денга грознице.

У свету се спроводе бројне студије чији је циљ разјашњавање епизоотиолошких циклуса одржавања појединих векторских зооноза (Tsai и Chandler, 2007). Тако је на пример недавно установљено да постоје силватични циклуси у случају инфекција арбовирусима (денга грознице, денга хеморагичне грознице и грознице пешчаних мушица) који подразумевају умножавање вируса у дивљим глодарима прашуме, преношење путем вектора (комараца) са једне стране и „урбаног“ циклуса (човек-комарац-човек). По свему судећи „урбани“ циклус није повезан са „силватичним“ зато што се код људи налази виремија довољног интензитета и дужине трајања за одржавање вируса у популацији вектора и људи. Међутим, свакако постоји и могућност да је „силватични“ циклус неопходан као резервоар вируса у природи.

У случају грознице долине Рифта, не постоји „силватични“ циклус. Неколико врста комараца (*Aedes*) преносе вирус и то како вертикално тако и транс-стадијумски. Комарци полажу инфицирана јаја у плавна подручја, па тако вирус преживи дужи период времена (током суше годинама). При поновном плављењу, долази до излегања нових генерација вектора и новог циклуса епизоотије при чему се вирус умножава у пријемчивим кичмењацима (овце, козе, говеда и човек) (Anyamba и сар., 2009).

Глобално ширење арбовирусних инфекција при чему већина спадају у зоонозе, у протеклих неколико деценија изненађује епизоотиологе и епидемиологе. Примери за то су ширење грознице Западног Нила по Европи и Северној Америци (Nash и сар., 2001) као и грознице долине Рифта у региону блиског Истока (Саудијска Арабија). Перзистенција увежене епизоотије грознице Западног Нила у САД није условљена присуством *St. Louis* енцефалитиса (ендемски присутна зооноза у северној Америци). Насупрот томе, ширење Јапанског енцефалитиса у Аустралији, вероватно је спречено или барем успорено зато што дивље свиње тог континента поседују неутрализациона антитела специфична за изазивача грознице долине *Murray*, вирус који је антигено сличан вирусу који изазива Јапански енцефалитис као и *Kunjin* вирусу (Mackenzie, 1999).

Конго Кримска хеморагична грозница

Обољење које је први пут описано 1944. године на Криму, вирусне је етиологије. Изазивач је вирус из фамилије Бунјавируса, род Наировирус, а кога преносе крпељи. Појављује се и у Србији, околним земљама, Русији, Турској, Кини и у већини земаља блиског и далеког истока (Leblebicioglu, 2010). Регистровано је и у Аустралији и јужној Африци. У ендемским и ензоотским регионима, оболе људи и домаће животиње (говеда, овце, козе и камиле). Резервоари вируса су коњи, јежеви и глодари, а вирус је изолован из више од 30 врста крпеља (*Hyalomma*, *Ixodes*) у којима је доказана трансваријална и транс-стадијумска трансмисија (Flick и Whitehouse, 2005). Међутим, за одржавање вируса у природи неопходан је циклус крпељ-кичмењак. Просторна дистрибуција болести се већим делом поклапа са дистрибуцијом *Hyalomma* крпеља. Болест може да се шири инфицираним животињама (говеда, камиле). Извори инфекције су оболеле животиње које инфицирају крпеље, а инфекција људи може да буде и путем конзумирања контаминисаног меса (нојеви). Преношење Конго-Кримске хеморагичне грознице је путем вектора (крпеља) или контактом са инфицираним животињама. Ризик представља и манипулација

са животињама и њиховим месом, а није искључена ни могућност аерогеног начина инфицирања радника у лабораторијама.

После око недељу дана инкубације, први симптом код људи је повишење телесне температуре, слабост, дрхтавица, болови у глави, екстремитетима и леђима. Чест симптом је повраћање. Кожа на лицу и врату је црвена и отечена. После 4 - 5 дана, уочавају се хеморагије у виду петехија по кожи целог тела, слузокожама, крв у фецесу и мокраћи. Леталитет је од 30 до 50% и већи је у случају да се ради о израженим крварењима (Tsai и Chandler, 2003). Дијагноза се поставља на основу епидемиолошке анамнезе у ком случају пажња треба да се обрати на присуство крпеља као и на рад са животињама. Антиген вируса може да се докаже методом реакције ланчане полимеразе (PCR) или посредно, доказивањем сероконверзије (*IgM*). Диференцијално дијагностички у обзир долазе септичка стања, лептоспироза, борелиоза, маларија, денга или рикетиоза (тифус).

Оболеле особе се третирају у јединицама интензивне неге и уз строге мере изолације, а поред неспецифичне терапије чији је циљ подизање опште отпорности организма, примењује се и антивирусна терапија (Soares-Weiser и сар., 2010). У Русији се примењује инактивисана вакцина, а од мера неспецифичне профилаксе потребно је да се обрати пажња на могућност преноса инфекције током контакта са оболелим особама или животињама (говеда, овце, козе и камиле). Посебна пажња мора да се обрати током обраде узорака ткива, у лабораторији.

Централно и источноевропски крпељски енцефалитис

Флавивируси који се преносе крпељима, који изазивају енцефалитисе познати су одавно, а њихова распрострањеност често утиче и на давање имена самих узрочника. Наиме, у региону Европе, одавно се зна да постоје вируси изазивачи тзв. централноевропског и источноевропског крпељског енцефалитиса (Неуман и сар., 2010).

Најзначајнији резервоари вируса изазивача централно и источноевропског крпељског енцефалитиса су дивљи глодари (ровчице, кртице), а виремија довољног интензитета може да се развије и у дивљим (јелен, јеж) и домаћим врстама животиња (овце, козе, говеда и пси). Виремија у врстама-резервоарима вируса у природи је неопходан услов за дистрибуцију Европских енцефалитиса у једном региону (Kaiser, 2008). Недавно је доказано да се вируси могу да умножавају и у слепим мишевима и воденим птицама.

Оба вируса се преносе крпељима и то *Ixodes Ricinus*, *Ixodes persulcatus*,

Dermacentor marginatus, *D. silvarum* као и неким врстама *Haemaphysalis*. Најчешће се крпељи у стадијуму нимфе инфицирају хранећи се на вiremичним домаћинима, кичмењацима. Једном заражени, крпељи преносе инфект на наредне генерације при чему је сваки развојни облик паразита, инфективан тј. способан да хранећи се на домаћину (кичмењаку), пренесе узрочнике централноевропског и источноевропског крпељског енцефалитиса. Трансмисија између заражене јединке (и особе) и пријемчиве, није могућа. Крпељи не само да су вектори вируса већ служе и као његови резервоари. Вируси се у крпељима преносе трансоваријално и транс-стадијумски. У Европи, случајеви крпељских енцефалитиса се појављују током периода маја и јуна (централноевропски крпељски енцефалитис) и у пролеће и јесен (источноевропски крпељски енцефалитис). Централноевропски крпељски енцефалитис може да се пренесе људима и путем млека и непастеризованих производа од млека, а забележене су и инфекције радника у лабораторијама (Lasala и Holbrook, 2010).

Клиничком сликом код људи доминирају симптоми оштећења централног нервног система, а као и код осталих флавивирусних инфекција, повишење телесне температуре је двофазно. Нарочито су под ризиком особе које бораве у природи (сточари, шумари). До 30% инфицираних особа има изражене симптоме у виду двофазног повишења телесне температуре. Код деце су симптоми ређи. После првог повишења телесне температуре, уследи период без симптома. Менингоенцефалитис прати другу фазу повишења телесне температуре током које се налазе неспецифични симптоми који наликују онима код грипа (болови у зглобовима, главобоља, гастроинтестиналне сметње). У тежим случајевима, налазе се менингитис, енцефалитис, наглашене главобоље, парезе и парализе. Степен леталитета је мањи код централноевропског енцефалитиса (1-5%) у односу на источноевропски тип (до 20%), а уопштено је мањи код деце (Logar и сар., 2000).

Дијагностика крпељских енцефалитиса је комплексна и пре свега се односи на праћење појаве у пријемчивим врстама животиња као и на познавање епизоотиолошке ситуације у смислу сезоне активности вектора или конзумације некуваног млека. Од значаја може да буде налажење угинулих дивљих животиња, које би могле да служе као резервоари вируса. Директно доказивање вируса је тешко, с обзиром да се вирус у циркулацији налази релативно кратак период времена и када изостају симптоми. Са друге стране, вирус може да се докаже у ткиву мозга што свакако отежава дијагностичке поступке. Доказивање вируса европских крпељских енцефалитиса се обавља методама изолације на култури ћелија (неутрализациони тест) и доказивањем

гена вируса ланчаном реакцијом полимеразе. Сероконверзија (*IgM*) се доказује имуноензимским методама (Martin и сар., 2001). Диференцијално дијагностички у обзир долази грип, заушке, ентеровируси као и енцефалитиси друге етиологије.

Терапија европских крпељских енцефалитиса своди на одржавање хомеостазе пацијената. Специфична имунопрофилактика постоји, апликују се инактивисане вакцине. Међутим, вакцине не смеју да се дају после експозиције вируса. Исто се односи и на примену хиперимуних серума, код људи. Вакцинација се примењује код особа које су под већим ризиком (шумски радници, сточари) који живе у регионима у којима су крпељски енцефалитиси ендемски (Rendi-Wagner, 2008). Антиген у вакцини је инактивисан, а после прве имунизације која подразумева апликацију три дозе (0., 7. и 21. дана), ради се и бустеризација 1 до 3 године касније (Rendi-Wagner, 2006). Контраиндикувана је вакцинација после експозиције (Bröker и Kollaritsch, 2008). Неспецифична профилактика се односи на спречавање конзумације некуваног (и непастеризованог) млека, нарочито оваца и коза као и спречавање контакта са крпељима ношењем адекватне одеће и обуће.

У Републици Србији, дијагностика крпељског енцефалитиса, била је у почетку заснована на резултатима серолошких испитивања серума људи, сакупљених у периоду од 1962. па до 1969. године. Од укупно 1726 серума, позитивних је било од 1.1% (Срем) па до 52.6% (Санџак) (Petrović и сар., 2018). Употребом PCR 2014. и 2015. године, вирус је доказан код крпеља (*Ixodes ricinus*) који су сакупљени на територији Фрушке Горе и Београда (Potkonjak и сар., 2017). Испитивања рађена код животиња, указују на присуство специфичних антитела у серумима паса, коња, дивљих свиња, говеда и јелена, а 2017. године, доказано је присуство вируса код коња, у околини Пожаревца (Živojinović и сар., 2017).

Грозница долине Рифта

Долина Рифта се протеже великим делом источне Африке обухватајући пространство безмало величине Европе. Ензоотски и ендемски, у овом региону се појављује вирусна, векторска зооноза која прати епизоотије у популацијама оваца, коза и говеда. Узрочник, спада у фамилију Бунјавируса, род Флебовирус упркос чињеници да га не преносе пешчане мушице већ комарци. Обољење је регистровано у више од 30 земаља, а инциденција је повезана са кишним периодима у регионима јужно од Сахаре. Вирус је стално присутан у Кенији, Уганди, Намибији, Анголи и Нигерији, а недавно су

забележене епизоотије у Египту (1993. године) и на Мадагаскару (Jost и сар., 2010). Последња епизоотија ван ендемског региона је забележена у Саудијској Арабији и Јемену, 2000. године (Gerdes, 2004).

Резервоари вируса и врсте за његово умножавање у природи су овце, козе, говеда, биволи и камиле. Вирус могу да пренесу преко 40 врста комараца па се на основу те чињенице сматра да се ради о великом ризику од глобалне дистрибуције грознице долине Рифта. Пандемије су могуће и због чињенице да вирус, изазивач грознице долине Рифта није специфичан само за једну врсту вектора (комарца). У до тада „слободне“ регионе, вирус се најчешће уноси зараженим животињама, најчешће овцама (Anyamba и сар., 2009). У популацијама пријемчивих врста, вирус преносе вектори (врсте *Stegomia* и *Culex*). На исти начин могу да се заразе и људи међутим, чешће су у ризику особе које су у контакту са контаминисаним месом (радници у кланицама) и ветеринари. Вирус се у векторима преноси трансоваријално, а *Stegomia* комарци служе и као резервоари узрочника у природи. Инфициране женке комарца легу заражена јаја која осушена могу да преживе дужи период времена (годинама). Епизоотија почиње после следеће кишне сезоне, када се из јаја излегу нове генерације комараца. Поред овог, биолошког начина преношења вируса, доказана је и могућност механичке трансмисије путем мува, комараца и других хематофагних инсеката.

Нарочито су на инфекцију осетљиве гравидне овце и козе. Поред абортуса, налази се хепатитис и енцефалитис, а смртност је већа код млађих животиња. Клинички, болест код људи почиње повишењем телесне температуре, слабошћу, укоченошћу, боловима у мишићима и леђима, осипом по кожи (макулопапуларни осип), а ове симптоме прате и гастроинтестиналне сметње. Најчешће се особа опорави у року од 2 до 7 дана. Међутим, код 1-3% пацијената, налазе се хеморагије и отказивање бубрега у ком случају је леталитет и до 50%. Око месец дана после првих акутних симптома, код ових пацијената налазе се енцефалитис, главобоља, спазми, симптоми оштећења централног нервног система и кома (Kahlon и сар., 2010). Најчешћа нежељена последица је слепило као последица оштећења ретине (Al-Hazmi и сар., 2005). Од укупно 140 случајева оболевања у Саудијској Арабији и Јемену (2000. године), леталитет је износио 19% при чему се сматра да значајан број блажих случајева није био пријављен. У највећем броју случајева људи су се заражавали путем контакта са животињама поред чињенице да су сви били у контакту са комарцима (*Stegomia* и *Culex*). Компликације су биле у виду ретинитиса, хепатитиса, отказивања бубрега, хеморагија и енцефалитиса.

Дијагноза грознице долине Рифта се заснива на епизоотиолошкој и

епидемиолошкој анамнези. На грозницу долине Рифта је потребно да се посумња уколико се појаве учестали абортуси код оваца и говеда, угињавање јагањаца и телади као угињавање гравидних оваца и говеда. Током акутне фазе болести, вирус може да се изолује из циркулације, у лабораторији методом култура ћелија или доказивањем вирусног генома, ланчаном реакцијом полимеразе (Sall и сар., 2001). Током фазе конвалесценције, серолошким реакцијама може да се докаже сероконверзија. У случају енцефалитиса, *IgM* антитела могу да се покажу и у цереброспиналној течности. Диференцијално дијагностички у обзир долазе хеморагичне болести, енцефалитиси и код животиња абортуси.

Код оболелих особа у смислу терапије може да се апликује интерферон и специфични анти-вирусни серум (Bouloy и Flick, 2009). Успех је уочен и код примене антивирусних лекова (рибавирин).

Специфична профилакса за овце постоји. Примењује се како инактивисана (говеда) тако и вакцина у којој је имуноген жив, ослабљен (овце) вирус. Обе вакцине могу да се користе и код људи али је њихова примена за сада ограничена (LaBeud и сар., 2010). Најбољи начин контроле грознице долине Рифта јесте имунизација пријемчивих врста животиња (овце и говеда), контрола вектора и поштовање зоохигијенских мера у кланицама и током манипулације са потенцијално зараженим животињама (кланице, обележавање животиња, помоћ при порођају и сл).

Chikungunya

Ради се о векторској зоонози која се појављује у Африци и Азији (јужна и југоисточна). Основни симптоми су болови у зглобовима и макопапуларни осип по кожи. Код птица (резервоара) симптоми изостају. Изазивач је Тогавирус (алфа), а обољење је ендемског (и ензоотског) карактера у свим регионима јужно од Сахаре као и на југу и југоистоку Азије. Недавно је обољење регистровано и у Јужној Америци, а 2007. године, обољење појавило и у Италију (Liumbruno и сар., 2008). Ризик од преноса инфекција *Chikungunya* у Еврпу постоји, нарочито као последица глобалних промена климатских услова са једне стране и интензивног и брзог транспорта потенцијалних клицоноша, са друге стране (Gould и Higgs, 2009; Pistone и сар., 2009).

Резервоари у природи су дивљи примати, слепи мишеви и птице, а поред урбаног циклуса (човек-вектор-човек) постоји и рурални односно, силватични. Трансмисија *Chikungunya* вируса се обавља путем вектора, комараца (*Aedes*, односно по новој номенклатури *Stegomyia*), при чему код комараца не постоји

вертикални пренос вируса. Основни резервоар вируса су људи који заразе комарце. Директан пренос са човека на човека није забележен. У Италији је најзначајнији вектор вируса *Stegomyia albopicta*; ранији назив *Aedes albopictus* (Talbalaghi и сар., 2010).

Клинички, налази се нагли пораст телесне температуре и одмах после тога јаки болови у зглобовима, па пацијент не може да се креће. Налазе се и мијалгије, мучнина, главобоља, носни исcedак и коњунктивитис, фотофобија (Borgherini и сар., 2007). Макопапуларни осип по кожи уследи два до 5 дана касније, а могу да се уоче и хеморагије по кожи. Просечни леталитет је 0.4%, а код деце 2.8% (Economidou и сар., 2009). Бол и оток зглобова може да траје недељама али је после тога опоравак потпун.

У ендемским регионима света, дијагноза се поставља на основу анамнезе и доказивања вирусног антигена (PCR), а серолошка дијагностика није поуздана услед постојања унакрсног имунитета са другим алфавирусима. Ипак, доказивање сероконверзије има значаја с обзиром да се унакрсно реактивни вируси појављују у различитим регионима света у односу на *Chikungunya* вирус (Grivard и сар., 2007).

Терапија је симптоматска, а у случајевима изражених болова у зглобовима, потребно је применити снажне аналгетике. Употребу стероидних препарата треба избегавати. Специфична профилакса у комерцијалној употреби за сада не постоји. Неспецифична профилакса се односи на спречавање контакта са комарцима (мреже и репеленти), а у регионима где се *Chikungunya* вирус не појављује, потребно је на сваки начин да се искључи могућност контакта комараца са виремичним особама, а све у циљу избегавања отпочињања урбаног циклуса преко *Stegomyia albopicta* комараца. Нарочита пажња треба да се посвети ризику од уноса вируса путем виремичних особа које су боравиле у ендемским регионима света (Chen и Wilson, 2010). У ензоотским и ендемским регионима, од великог значаја је контрола вектора у околини градова.

Жута грозница

Жута грозница је векторска зооноза, вирусне етиологије (*Flaviviridae*, род *Flavivirus*), која се карактерише иктерусом и повишењем телесне температуре код примата (и људи). У ензоотским и ендемским регионима света, паралелно постоје урбани и сивлатични (џунгле Африке и Јужне Америке) циклуси који се међусобно преклапају (Barnett, 2007). Наиме, резервоари вируса су мајмуни, а у оквиру урбаног циклуса, вирус се преноси међу људима путем комараца (Vasilakis и Weaver, 2008).

Обољење је ендемски присутно у великом делу Африке у коме, пре свега у великим градовима живи преко 450 милиона људи. У тим регионима, налазе се и више врста резервоара (мајмуна). У Јужној Америци, епизоотиолошке и епидемиолошке карактеристике су исте па отуда постоји велика могућност преливања ове зоонозе и у друге регионе света (Gardner и Ryman, 2010). Жута грозница је ендемско обољење у руралним регионима, а сматра се да се контролом вектора може да постигне ерадикација у урбаним срединама (CDC, 1999). Леталитет може да буде велики, чак и преко 55%, а нарочито су под ризиком популације људи који се налазе по ободима великих градова, а који живе у нехигијенским насељима. Званични подаци (WHO, 2009) указују да је број случајева неколико хиљада на годишњем нивоу. Међутим, сматра се да је број случајева жуте грознице у свету сто пута већи. Значајан број случајева на пример у Бразилу и Боливији, нису могли да буду повезани са путовањима тих особа у ензоотске и ендемске регионе па може да се закључи да постоји потенцијал појављивања жаришта и ван региона где је ово обољење присутно. Слично се односи и на регионе у Африци што указује на могућност настанка епидемија у урбаним срединама (Mutebi и Barrett, 2002).

Жута грозница се не појављује у Азији што може да се објасни унакрсном реактивношћу узрочника са вирусом који изазва денга грозницу као и слабијом компетентношћу вектора (*Stegomyia aegypti*). У Африци и Јужној Америци, жута грозница и денга грозница коегзистирају у истим регионима (Gubler, 2004). У односу на становнике Северне полулопте, нарочито су под ризиком путници који се враћају из региона у којима је жута грозница ендемски присутна (CDC, 2000; Muñoz и сар., 2008).

Вектори жуте грознице су комарци (*Stegomyia albopicta* и *S. aegypti*).

Клинички, обољење код људи може да протиче инапарентно па до тешких облика са фаталним исходом (CDC, 1999). У случају благог тока, симптоми наликују на грип. Повећање телесне температуре је нагло, налазе се брадикардија, главобоља, мучнина, крварење из носа, болови у мишићима и наглашени крвни судови коњунктива. Симптоми трају релативно кратко, до неколико дана. У тешким случајевима, уочавају се ремисије уз појаву иктеруса, повраћање крвавог садржаја, мелене, урогениталног крварења и отказивања бубрега (олигурија и анурија). Фаталним исходима претходе делиријум и кома. Леталитет је од 10 па до 50%. Дијагноза жуте грознице се поставља на основу епидемиолошке анамнезе, симптома и лабораторијског налаза (албуминурија и продужено протромбинско време). Вирус може да се изолује из крви или цереброспиналне течности у току прве фебрилне фазе. Примењује се метода изолације на култури ћелијаи доказивање вирусног

генома (PCR). Користи се и доказивање сероконверзије помоћу ELISA теста, а специфична антивирусна *IgM* антитела могу да се докажу и до две године после пребољења. Диференцијално дијагностички, у обзир долазе маларија, хеморагична форма денга грознице, хеморагичне грознице (Марбург, Ебола, Конго-Кримска грозница), менингитиси, лептоспироза, хепатитис и хантавирусна инфекција. Терапија жуте грознице је симптоматска, а нарочито се примењује хемодијализа у случају отказивања бубрега и јетре.

Специфична профилакса жуте грознице постоји. Нарочито су вакцине намењене особама које треба да путују у ендемски захваћене регионе света као и за оне који из тих региона путују у „слободне“ земље. У суштини, постоје два типа законских регулатива. Први тип се односи на земље у ендемски и ензоотски захваћеним регионима где се тражи потврда о вакцинацији особа. Други тип регулативе подразумева земље које су „слободне“ од жуте грознице али где постоје потенцијални вектори вируса. У том случају, потврда о вакцинацији се тражи за оне особе које су држављани земаља које се налазе у ендемски захваћеним регионима (државама) или за особе које су раније боравиле у таквим земљама. Користе се два типа живих вакцина у којима је вирус атенуиран. Вакцинисане особе су заштићене у дужем периоду времена. Уочени су нежељени ефекти (Ouelami и сар., 1994), после вакцинације особа са оштећеним имунским системом (Rescaveur и сар., 2000) као и старијих особа (преко 60 година).

Денга хеморагична грозница

Ради се о најозбиљнијој и најчешћој зоонози коју преносе вектори, међутим инфекција је бенигног карактера. Сматра се да је у целом свету преко 2 милијарде људи у преко 100 држава под ризиком да оболи (WHO, 2009), а да је годишње до 50 милиона особа инфицирано (Kyle и Harris, 2008). Око 1% инфицираних особа оболи са тешким клиничким симптомима у виду денга хеморагичне грознице и денга шок синдрома. Треба да се напомене да је ризик од тежег облика болести већи после наредног контакта са вирусом. Наиме, током првог контакта, тежи облици се јављају у 0.2% случајева. Овај проценат је 20% при наредној инфекцији. Нарочито су осетљива деца. Денга хеморагична грозница је најчешћа векторска зооноза која се налази код туриста који су боравили у ендемским регионима света и који инфекцију уносе у државу, односно регион у коме се вирус до тада није појављивао. Вирус, изазивач денга грознице спадау флавивирусе.

Денга грозница се не појављује (за сада) само на територији Европе и

Антарктика. Сматра се да до 50 милиона људи годишње оболи, а нарочито је преваленција велика у Бразилу (око милион случајева током 2010. године). Од нарочитог епизоотиолошког и епидемиолошког значаја је да се у до тада „слободним“ регионима и државама налазе вектори (*Stegomyia aegypti* и *S. albopicta*) који су компетентни вектори узрочника Денга грознице (Jansen и Beebe, 2010). До 2014. године, у Јапану су се случајеви обољења појављивали само код особа које су претходно путовале у ендемски захваћене регионе. Међутим, те године је забележено инфицирање 20 особа, а путем вектора у парку у централном делу Токија.

У ендемски захваћеним регионима (Централна и Јужна Америка, екваторијална Африка и северна Аустралија), обољење код људи пролази инапарентно (CDC, 1999). Постоје међутим региони у којима се у већем проценту јављају теже форме болести у виду хеморагичне грознице и септичког синдрома (Индија, Индонезија, Филипини). Код животиња (шимпанза, гибона и макаки мајмуна) виремија је довољног интензитета и дужине трајања да доведе до инфекције вектора. Нарочито је велика преваленција заражености мајмуна у Африци и Индонезији. Друге врсте мајмуна нису тако добри резервоари (краткотрајна и виремија ниског степена)

Вирус, узрочник денга грознице се преноси векторима, комарцима (*Stegomyia aegypti*, *S. albopicta* и *S. africana*) (Jansen и Beebe, 2010). Ради се о биолошким векторима и резервоарима у природи пошто се вирус преноси трансоваријално на наредне генерације вектора. Повезаност урбаног и сивог циклуса денга грознице се одржава захваљујући *Stegomyia nivea*, комарцу који се храни како на приматима (мајмунима) тако и на човеку. Може да се каже да се ради о зоонози која је ограничена на популацију људи у оквиру урбаног циклуса али која може да постане епидемија у регионима близу прашума. Вирус, узрочник денга грознице може да се пренесе и трансфузијом.

Клинички, после инкубације од око недељу дана, налазе се нагло повишење телесне температуре, главобоља и мијалгије, ретроорбитални и болови у епигастријуму. Поред тога, налази се мучнина, повраћање, инапетенција, инсомнија и слабост. По некада, присутна су и крварења (мелена, хематурија, епистаксис). Ради се о првој фази болести која траје неколико дана. Друга фаза се карактерише блажим симптомима. У тежим случајевима, налази се хеморагични синдром и септички шок када су присутни висока телесна температура, крварења, увећање јетре и шок. Сматра се да је тежа форма болести последица имунопатогенетских механизма, односно присуства имунских комплекса састављених од не-неутрализационих антитела и вирусних антигена (Halstead и сар., 2010). Нарочито је то случај када се особа

зарази са два типа денга вируса (Martina и сар., 2009). Антитела присутна као последица прве инфекције, не неутралишу други тип вируса али са њим формирају имунске комплексе и започињу продуктивну инфекцију макрофага путем Фц рецептора (Rodenhuis-Zybert и сар., 2010). Данас се зна да постоје шест фактора који условљавају теже облике денга грознице (хеморагична грозница и септички шок):

1. инфекција у присуству не-неутрализационих антитела,
2. ако је други вирус пореклом из југоисточне Азије,
3. жене чешће оболе у тежој форми,
4. чешће у тежој форми оболе становници Азије и Кавкаски тип људи; црнци ређе оболе,
5. најчешће у тежем облику оболе деца млађа од 15 година (Jain и Chaturvedi, 2010) и
6. новорођенчад са матерналним антителима на различити тип вируса

Дијагноза денга грознице се поставља на основу епидемиолошке анамнезе (путовање у ендемски регион) и клиничких симптома. Вирус може да се изолује из циркулације, а од значаја је и налаз хиповолуминемije крви (повећани хематокрит) и поремећаја коагулације крви. Вирус може да се изолује на култури ћелија (Teles и сар., 2005). Из ткива јетре, плућа, бубрега, слезине и лимфних чворова, узетих биопсијом, могу да се раде методе доказивања вирусног антигена (ТФА) или вирусних гена, ланчаном реакцијом полимеразе (Conseição и сар., 2010).

Сероконврзија подразумева налаз *IgM* анти-вирусних антитела (Schwartz и сар., 2000). Диференцијално дијагностички у обзир долазе грип, хепатитис, лептоспироза, маларија, хеморагичне грознице (Ебола, Марбург, хантавируси), рикетиозе као и остале векторске зоонозе (*Chikungunya*, Рифт). Специфична терапија Денга грознице не постоји.

Специфична профилакса се састоји из апликације четворовалентне вакцине у којој се налазе атенуирана сва четири типа вируса међутим, безбедност овог препарата још увек није потврђена (Swaminathan и сар., 2010). Исто се односи и на рекомбинантну вакцину у којој се као имуноген налази *Theiler 17D* сој вируса против жуте грознице (Miller, 2010; Van Der Most и сар., 2000).

Основни начин борбе против Денга грознице је контрола вектора (*S. aegypti*) при чему се успех односи и на спречавање појављивања не само денга већ и *Chikungunya* грознице (Chen и Wilson, 2010). Особама које путују у ендемски захваћене регионе света (Венецуела, југоисток Азије), саветује се примена одговарајуће одеће, мреже на прозорима и репелената (CDC, 2012). Нарочито су у ризику особе које су већ биле инфициране денга вирусом (WHO, 2009).

Грозница реке Ross

У Аустралији и Океанији, обољење је познато и као епидемијски полиартритис. Узрочник је Тогавирус (Алфа). Инциденција грознице реке Рос, може да се предвиди на основу метеоролошких података (падавине и температуре), а у ендемском региону, обољење се најчешће појављује у периоду од јануара до маја (Woodruff, 2006). Установљена је серопреваленција код људи у оним регионима у којима нису биле пријављене клинички испољене инфекције. Уколико би се појавило у Европи, епизоотије и епидемије би се очекивале током периода активности вектора, комараца (*Aedes* и *Culex*). Поред човека, пријемчиве су и многе врсте домаћих животиња (говеда, овце, козхе, коњи, свиње, пси) у дивљих (глодари, птице) животиња (Jasurp и сар., 2008). Још увек није познат механизам преживљавања вируса у периоду неактивности комараца (Kelly-Hope и сар., 2004).

У векторима (комарцима) вирус се преноси вертикално са једне генерације инсеката на наредну, а сматра се да је могућ и урбани епидемиолошки циклус (човек-вектор-човек).

Од инфицираних људи, 20-30% покаже симптоме у виду благог повишења телесне температуре после чега се налазе болови у зглобовима (руке и стопала нарочито) који могу и да отеку. Многи пацијенти имају макулопапуларни осип по телу и екстремитетима, а код неких, налазе се и петехије. Болест је бенигног карактера, а болови у зглобовима нестају у року од 3 месеца, међутим могу да трају годинама. Грозница реке Рос је обољење у чијој патогенези значајну улогу игра однос макрофага и вируса (Rulli, 2007). Наиме, вирус спречава експресију гена у макрофагима, а који су задужени за антивирусну одбрану (Linn и сар., 1996). Дијагноза се поставља на основу доказивања антигена вируса (PCR) у узорцима (крв и синовијална течност) као и на основу сероконверзије (ELISA). У регионима где је грозница реке Рос ендемско обољење, дијагноза се најчешће поставља на основу епидемијских података (сезона вектора) и клиничких манифестација. Диференцијално дијагностички у обзир долазе рубеола, Лајмска болест, *Chikungunya* вирусна инфекција и реуматска грозница. Терапија у највећем броју случајева није потребна, а ако се дају антиреуматски лекови, потребно је искључити употребу стероидних препарата. Специфичне профилаксе (вакцине) нема.

Усуту вирусна инфекција

Иако је прва изолација овог Флавивируса била половином 20. века (1959. године), значај овог вируса је уочен тек када је изолован из угинулог црног

коса (Weissenböck и сар., 2002), у Аустрији (2001. године). Обољење преносе комарци, а дивље птице су резервоари вируса у природи. Код прица, Усуту вирус изазива тешке инфекције са великим степеном леталитета. У Европи, вектори су *Culex* комарци. Код људи, вирус не изазива никакве симптоме међутим, под ризиком су особе са другим здравственим проблемима (Cavini и сар., 2009) или оне које примају имуносупримирајућу терапију. Код коња и људи, виремија није довољног интензитета да би ове врсте могле да се сматрају резервоарима.

Специфична анти Усуту вирусна антитета доказана су и код птица и у Србији (Petrović и сар., 2013).

Грозница Wesselsbron

Флавивирус који је ограничен на регион јужне и централне Африке, изазива ову грозницу коју људима преносе комарци, а резервоари су још увек непознате дивље врсте животиња. Поред Африке, вирус је присутан и у Азији (Тајланд). Вектори изазивача Веселсбронске грознице су комарци (*Aedes* односно *Stegomyia* врсте), а од домаћих врста животиња пријемчиве су овце и говеда. Вирус може да се умножава и у канидима (којот) и птицама (патке). Комарци, вектори се инфицирају хранећи се на домаћим врстама животиња (овца и говеда). Људи (ветеринари, сточари) могу да се заразе и контактом са контаминираним месом и органима заражених животиња као и током рада са узорцима у лабораторији (Diallo и сар., 2005).

Ради се о бенигном обољењу, акутног тока. Симптоми ако се појаве, су у виду повишења телесне температуре, главобоље, болова у мишићима и зглобовима и осипа. Чест симптом је оток јетре и слезине. У тежим случајевима, налазе се енцефалитис (поремећај свести), поремећај вида и фотофобија. Код оваца, симптоми наликују на грозницу долине Рифта. Гравидне животиње побаци, а код новорођених јагањаца, Веселсбронска грозница је фатално обољење. Дијагноза се поставља на основу епидемиолошке анамнезе у ком случају је од значаја контакт са оболелим животињама и њиховим органима (побачаени плод код оваца). Током фазе повишене телесне температуре, вирус може да се изолује из крви и бриса грла. Доказивање вирусног генома се обавља PCR методом, а серолошким анализама може да се докаже сероконверзија (Johnson и сар., 2000). Диференцијално дијагностички, треба искључити грип, а у региону у коме се појављује и ако је било контакта са овцама, и грозницу долине Рифта. Терапија Веселсбронске грознице је симптоматска, а профилакса се своди на контролу вектора. Нема специфичне профилаксе (вакцине).

Енцефалитис долине Murray

Инфекције са флавивирусом, изазивачем енцефалитиса долине *Murray*, ограничене су (за сада) на Аустралију и Нову Гвинеју (Hupratz и сар., 2009). Антигено, овај је вирус сличан са изазивачем грознице Западног Нила, а антитета против Јапанског енцефалитиса неутралишу и овај вирус.

У периоду од 1917. до 1974. године, регистровано је у Аустралији осам епидемија енцефалитиса долине *Murray*. Епидемије су биле током сезоне активности вектора (комараца, *Culex annulirostris*), врсте која полаже јаја у барама и малим језерима (Broom и сар., 2003). Што се тиче других региона света, постоји могућност уноса вируса, изазивача енцефалитиса долине *Murray* (Stich и сар., 2003).

Клинички, ради се о тешком обољењу упркос чињеници да се само код 0.2% инфицираних особа појављују симптоми. Болест почиње нагло са главобољом, фотофобијом, анорексијом, наглашеном слабошћу, повраћањем, повишеном телесном температуром и менингитисом. У тешким случајевима, после око 2 недеље изражених симптома, следи кома и смрт. Парализа моторних нерава може да доведе до отежаног гутања и дисања. Током првих епидемија, леталитет је био висок (60%), а касније је смањен на 20%. Код преболелих особа, често остају трајне последице у виду психолошких и неуролошких сметњи. Упркос смањеном степену смртности у новије време се уочава повећање процента особа које су преболеле, а код којих су остале трајне неуролошке сметње. Дијагноза се поставља на основу епидемиолошких података, клиничких симптома и лабораторијских налаза. Вирус може да се изолује само из možданог ткива, дакле пост мортем, ланчаном реакцијом полимеразе (Studdert и сар., 2003). Сероконверзија (*IgM*, може да се докаже ензимским имунским реакцијама (ELISA). Диференцијално дијагностички у обзир долазе енцефалитиси друге етиологије, нарочито код особа које су путовале у регионе света у којима се ендемски и ензоотски појављују други флави вируси. Терапија је симптоматска, а од великог значаја је интензивна нега пацијената. Специфична терапија не постоји. У регионима у којима је енцефалитис долине *Murray* ендемски, спроводи се контрола комараца (ларвициди и третман против одраслих облика вектора).

ЗАКЉУЧАК

Сведоци смо били „преливања“ корона вируса из за сада недовољно дефинисаних популација резервоара SARS-CoV-2 ка људима у протеклих три године. Слични епизоотиолошки и епидемиолошки сценарији, када се из

једног региона као пожар прошири нека заразна болест, могу да се очекују и у случају преко 100 арбовируса који у различитим регионима света циркулишу у мање или више познатим природним циклусима. Нарочито се у том контексту издвајају флавиовируси који су у епизоотиолошком и епидемиолошком смислу веома динамични. Тако на пример, денга хеморагична грозница је безмало била ерадикивана у Централној Америци шездесетих и седамдесетих година 20. века. Међутим, од 1000 пријављених случајева 1958. године у Африци и југоисточној Азији, дошло се до 500.000 случајева 1998. године, при чему се ово обољење почело поново да појављује у свим регионима Јужне и Централне Америке.

Сви арбовируси (са изузетком изазивача афричке куге свиња) као генетски материјал поседују РНК молекула. Ради се о веома адаптабилном молекулу који не само да има способност мутирања у односу на вируленцију већ и у односу на могућност репликације у врстама које су до тада биле непријемљиве. Ради се о врстама како вектора (комараца и артропода) тако и врстама дивљих и домаћих животиња. То једноставно значи да неки од арбовируса, уносом у до тада „слободне“ регионе и континенте, може да стекне афинитет како за локалну популацију вектора тако и да пронађе нову врсту резервоара (животињу) у природи. На тај би се начин формирао нови епизоотиолошки и епидемиолошки циклус на новој локацији и са новим „играчима“.

Сматра се да је ширење великог броја арбовирусних инфекција последица промене климатских околности, односно глобалног отопљења и као последице тога, освајања нових територија од стране вектора. Исто тако, у великим регионима света, до пре три деценије у употреби је био пестицид ДДТ (*dichlordiphenyltrichlorethane*) којим су ефикасно контролисане популације вектора, пре свега комараца (*Stegomyia*, *Anopheles* и др). Као последица забране овог пестицида, глобално долази до значајног повећања бројности вектора што заједно са отопљавањем односно, већим степеном преживљавања вектора, утиче битно на повећање ризика од ширења векторских зооноза.

Ветеринарска служба Р. Србије и региона, дала је допринос контроли коронавирусних инфекција у протекле три године, пре свега у дијагностичком смислу. Истовремено, специјалисти из епизоотиологије, значајно су утицали да се што више појасне принципи ширења, контроле, сузбијања и искорењивања SARS-CoV-2 пандемије. Својим уско стручним познавањем заразних болести животиња и латералним приступом који обезбеђује епизоотиологија, ветеринари свакако дају значајан допринос систему „једног здравља“ па може да се закључи да постоји велика вероватноћа да ће ветеринари бити први који ће уочити појаву нових векторских зооноза на свом терену.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Al-Hazmi A., Al-Rajhi A. A., Abboud E. B., Ayoola E. A., Al-Hazmi M., Saadi R., Ahmed N. (2005): Ocular complications of Rift Valley fever outbreak in Saudi Arabia. *Ophthalmology*, 112:313-318.
- Anyamba A., Chretien J-P, Small J., Tucker C. J., Formenty P. B., Richardson J. H., Britch S. C., Schnabel D. C., Erickson R. L., Linthicum K. J. (2009): Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:955-959.
- Arthur R. R., el-Sharkawy M. S, Cope S. E., Botros B. A., Oun S., Morrill J. C., Shope R. E., Hibbs R. G., Darwish M. A., Imam I. Z. (1993): Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *Lancet*, 342(8880):1149-50.
- Barnett E. D. (2007): Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.*, 44:850-856.
- Beaty B. J., Trent D. W., Roehrig J. T. (1988): Virus variation and evolution: mechanisms and epidemiological significance. In *The arboviruses: Epidemiology and ecology*, Vol. I. Ed. Monath T. P. CRC Press, 59-85.
- Borgherini G., Poubeau P., Staikowsky F., Lory M., Le Moullec N., Becquart J. P., Wengling C., Michault A., Paganin F. (2007): Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin Infect Dis.*, 44(11):1401-7.
- Bouloy M., Flick R. (2009): Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antivir. Res.*, 84:101-118.
- Bres P. (1988): Impact of arboviruse on human and animal health. In *The arboviruses: epidemiology and ecology*, Vol. I. Ed. Monath T. P. CRC Press, 1-18.
- Bröker M., Kollaritsch H. (2008): After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine*, 26:863-868.
- Broom A. K., Lindsay M. D. A., Plant A. J., Wright A. E., Condon R. J., Mackenzie J. S. (2002): Epizootic activity of Murray Valley encephalitis virus in an aboriginal community in the southeast Kimberley region of Western Australia: results of cross-sectional and longitudinal serologic studies. *Am J Trop Med Hyg.*, 67(3):319-23.
- Cavrini F., Gaibani P., Longo G., Pierro A. M., Rossini G., Bonilauri P., Gerunda G. E., Di Benedetto F., Pasetto A., Girardis M., Dottori M., Landini M. P., Sambri
-

- V. (2009): Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.*, 14(50):19448.
- CDC (1999): Candidate viral diseases for elimination or eradication. Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly. Rep., 48:86-90.
- CDC (2000): Fatal yellow fever in a traveler returning from Venezuela, 1999. Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly. Rep., 49:303-305.
- CDC (2012): Health Information for International Travel. Centers for Disease Control and Prevention.
- Chen L. H., Wilson M. E. (2010): Dengue and Chikungunya infections in travelers. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 23:438-444.
- Conceição T. M., Da Poian A. T., Sorgine M. H. F. (2009): A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods.*, 163(1):1-9.
- Diallo M., Nabeth P., Ba K., Sall A. A., Ba Y., Mondo M., Girault L., Abdalahi M. O., Mathiot C. (2005): Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Med Vet Entomol.*, 19(2):119-126.
- Dobie D. K., Blair C. D., Chandler L. J., Rayms-Keller A., McGaw M. M., Wasieloski L. P., Beaty B. J. (1997): Analysis of LaCrosse virus S mRNA 5' termini in infected mosquito cells and *Aedes triseriatus* mosquitoes. *J Virol.*, 71(6):4395-4399.
- Economopoulou A., Dominguez M., Helynck B., Sissoko D., Wichmann O., Quenel P., Germonneau P., Quatresous I. (2009): Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect.*, 137(4):534-41.
- Flick R., Whitehouse C. A. (2005): Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Curr. Mol. Med.*, 5:753-760.
- Gardner C. L., Ryman K. D. (2010): Yellow fever: a reemerging threat. *Clin. Lab. Med.*, 30:237-260.
- Gerdes G. H. (2004): Rift Valley fever. *Rev. Sci. Tech.*, 23:613-623.
- Gould E. A., Higgs S. (2009): Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 103:109-121.
- Grivard P., Le Roux K., Laurent P., Fianu A., Perrau J., Gigan J., Hoarau G., Grondin N., Staikowsky F., Favier F., Michault A. (2007): Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, 55(10):490-4.
- Gubler D. (2004): The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27:319-330.
-

- Halstead S. B., Mahalingam S., Marovich M. A., Ubol S., Mosser D. M. (2010): Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect. Dis.*, 10(10):712-722.
- Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S. R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A. (2010): A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8(1):33-50.
- Huppatz C., Kelly P. M., Levi C., Dalton C., Williams D., Durrheim D. N. (2009): Encephalitis in Australia, 1979-2006: trends and aetiologies. *Commun Dis Intell Q Rep*, 33(2):192-7.
- Jacups S. J., Whelan P. I., Currie B. J. (2008): Ross River virus and Barmah Forest virus infections: a review of history, ecology, and predictive models, with implications for tropical northern Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(2):283-297.
- Jain A., Chaturvedi U. C. (2010): Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:119-130.
- Jansen C. C., Beebe N. W. (2010): The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.*, 12:272-279.
- Johnson A. J., Martin D. A., Karabatsos N., Roehrig J. T. (2000): Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 38(5):1827-1831.
- Jost C. C., Nzietchueng S., Kihu S., Bett B., Njogu G., Swai E. S., Mariner J. C. (2010): Epidemiological Assessment of the Rift Valley Fever Outbreak in Kenya and Tanzania in 2006 and 2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(2): 65-72.
- Kahlon S. S., Peters C. J., Leduc J., Muchiri E. M., Muiruri S., Njenga M. K., Breiman R. B., White A. C. Jr., King C. H. (2010): Severe Rift Valley fever may present with a characteristic clinical syndrome. *Am J Trop Med Hyg.*, 82(3):371-375.
- Kaiser R. (2008): Tick-borne encephalitis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 22:561-575.
- Karabastos N. (1985): International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1147.
- Kelly-Hope L. A., Purdie D. M., Kay B. H. (2004): Ross River virus disease in Australia, 1886-1998, with analysis of risk factors associated with outbreaks. *J Med Entomol.*, 41(2):133-150.
- Kyle J. L., Harris E. (2008): Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62:71-92.
-

- LaBeaud A. D., Kazura J. W., King C. H. (2010): Advances in Rift Valley Fever Research: Insights for Disease Prevention. *Curr Opin Infect Dis.*, 23(5):403-408.
- Lasala P. R., Holbrook M. (2010): Tick-borne flaviviruses. *Clin. Lab. Med.*, 30:221-235.
- Leblebicioglu H. (2010): Crimean-Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int. J. Antimicrobiol.*, 36(1):S43-S46.
- Linn M. L., Aaskov J. G., Suhrbier A. (1996): Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J Gen Virol.*, 77 3:407-11.
- Liumbruno G. M., Calteri D., Petropulacos K., Mattivi A., Claudio P., Macini P., Tomasini I., Zucchelli P., Silvestri A. R., Sambri V., Pupella S., Catalano L., Piccinini V., Calizzani G., Grazzini G. (2008): The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transf.*, 6:199-210.
- Logar M., Arnez M., Kolbl J., Avsic-Zupanc T., Strle F. (2000): Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection*, 28(2):74-77.
- Ludwig G. V., Iacono-Connors L. C. (1993): Insect-transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. *In Vitro cell Dev. Bul*, 29A(4):296-309.
- Mackenzie J. S. (1999): Emerging viral diseases: an Australian perspective. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:1-8.
- Martin D. A., Muth D. A., Brown T., Johnson A. J., Karabatsos N. and Roehrig J. T. (2000): Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J. Clin. Microbiol.*, 38(5):1823-1826.
- Martina B. E. E., Koraka P., Osterhaus A. D. M. E. (2009): Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.*, 22(4):564-581.
- Miller N. (2010): Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 12:31-38.
- Monah T. P. (1994): Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2395-2400.
- Muñoz J., Vilella A., Domingo C., Nicolas J. M., Ory F., Corachan M., Tenorio A., Gascon J. (2008): Yellow fever-associated viscerotropic disease in Barcelona, Spain. *J Travel Med.*, 15(3):202-205.
- Mutebi J. P., Barrett A. D. (2002): The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes Infect.*, 4:1459-1468.
- Nash D., Mostashari V., Fine A., Miller J., O'Leary D., Murray K., Huang A.,
-

- Rosenberg A., Greenberg A., Sherman M., Wong S., Layton M. (2001): The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.*, 344(24):1807-1814.
- Oyelami S. A., Olaleye O. D., Oyejide C. O., Omilabu S. A., Affiliati B. A. F. (1994): Severe post-vaccination reaction to 17D yellow fever vaccine in Nigeria. *Rev Roum Virol.*, 45(1-2):25-30.
- Petrović T., Blazquez A. B., Lupulović D., Lazić G., Escribano-Romero E., Fabijan D., Kapetanov M., Lazić S., Saiz J. (2013): Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill.*, 18(44):1-8.
- Petrović T., Šekler M., Petrić D., Vidanović C., Potkonjak A., Hrnjaković I., Savić C. S., Debeljak Z., Lazić G., Čupina A. I., Lupulović D., Samojlović M., Jurišić A., Petrović A., Ivanović I., Milošević V., Lazić S. (2018): Flaviviruses at the territory of Serbia – present situation and challenges. *Archives of Vet. Medicine*, 11(2):53-70.
- Pistone T., Ezzedine K., Boisvert M., Receveur M-C., Schuffenecker I., Zeller H., Lafon M-E., Fleury H., Malvy D. (2009): Cluster of chikungunya virus infection in travelers returning from Senegal, 2006. *J Travel Med.*, 16(4):286-288.
- Porterfield J. S. (1995): Exotic viral infections. Chapman and Hall Medical.
- Potkonjak A., Petrović T., Ristanović E., Lalić I., Vračar V., Savić S., Turkulov V., Čanak G., Milošević V., Vidanović D., Jurišić A., Petrović A., Petrović V. (2017): Molecular Detection and Serological Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17(12):813-820.
- Receveur M. C., Thiébaud T., Vedy S., Malvy D., Mercié P., Bras M. L. (2000): Yellow fever vaccination of human immunodeficiency virus-infected patients: report of 2 cases. *Clin Infect Dis.*, 31(3):E7-8.
- Rendi-Wagner P. (2006): Persistence of antibodies after vaccination against tick-borne encephalitis. *Int. J. med. Microbiol.*, 296(40):202-207.
- Rendi-Wagner P. (2008): Advances in vaccination against tickborne encephalitis. *Expert Rev. Vacc.*, 7:589-596.
- Rico-Hesse R., Weaver S. C., de Siger J, Medina G., Salas R. A. (1995): Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:5278-5281.
- Rodenhuis-Zybert I. A., Wilschut J., Smit J. M. (2010): Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol. Life Sci.*, 67(16):2773-86.
-

- Rulli N. E., Melton J., Wilmes A., Gary Ewart G., Mahalingam S. (2007): The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. *Ann N Y Acad Sci.*, 1102:96-108.
- Sall A. A., Thonnon J., Sene O. K., Fall A., Ndiaye M., Baudez B., Mathiot C., Bouloy M. (2001): Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J Virol Methods*, 91(1):85-92.
- Schwartz E., Mileguir F., Grossman Z., Mendelson E. (2000): Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. *J Clin Virol.*, 19(3):169-173.
- Soares-Weiser K., Thomas S., Thomson G., Garner P. (2010): Ribavirin for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systemic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, 10:207.
- Stich A., Günther S., Drosten C., Emmerich P., Dwyer D. E., Hueston L., Hetzel W., Armin Kirschner A., Fleischer K. (2003): Clinical and laboratory findings on the first imported case of Murray Valley encephalitis in Europe. *Clin. Infect. Dis.*, 37:e19-e21.
- Studdert M. J., Azuolas J. K., Vasey J. R., Hall R. A., Ficorilli N., Huang J-A. (2003): Polymerase chain reaction tests for the identification of Ross River, Kunjin and Murray Valley encephalitis virus infections in horses. *Aust. Vet. J.*, 81:76-80.
- Swaminathan S., Batra G., Khanna N. (2010): Dengue vaccines: state of the art. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 20:819-835.
- Talbalaghi A., Moutailler S., Vazeille M., Failloux A-B. (2010): Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med. Vet. Entomol.*, 24:83-87.
- Teles F. R., Prazeres D. M., Lima-Filho L. J. (2005): Trends in dengue diagnosis. *Rev. Med. Virol.*, 15:287-302.
- Tsai T. F., Chandler L. J. (2003): Arboviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Ed. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Tenover F. C., Tenover K. C. ASM Press, 1553-1569.
- Tsai T. F., Chandler L. J. (2007): Arboviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Eds. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Landry M. S., Tenover F. C., Tenover K. C. ASM Press.
- Van Der Most R. G., Murali-Chrisna K., Ahmed R., Strauss J. H. (2000): Chimeric yellow fever/Dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus specific CD8 T-cell response. *J. Virol.*, 74:8094-8101.
- Vasilakis N., Weaver S. C. (2008): The history and evolution of the human dengue emergence. *Adv. Virus Res.*, 72:1-76.
-

- Walton T. E., Grayson M. A. (1988): Venezuelan equine encephalomyelitis. In *The arboviruses: epidemiology and ecology*, Vol 5. Ed. Monath T. P. CRC Press, 59-85.
- Weissenböck H., Kolodziejek J., Url A., Lussy H., Rebel-Bauder B., Nowotny N. (2002): Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis group, Central Europe. *Emerg Infect Dis*, 8:652–656.
- WHO (2009): Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organisation.
- Woodruff R. E. (2006): Early warning of Ross River virus epidemics: combining surveillance data on climate and mosquitoes. *Epidemiology*, 17:569-575.
- Živojinović M., Stokić Nikolić S., Dobrosavljević I., Lazić M., Radojičić S., Stojanović M., Veljović Lj. i Milićević V. (2017) Tick-borne encephalitis in Serbia. In 28. Counselling of veterinarians of Serbia, Book of Proceedings and Abstracts, 109-113.

Рад примљен: 16.08.2023.

Рад прихваћен: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301183V

UDK 616.993:619(497-12)

Review scientific paper

VECTOR ZOONOSES THAT MAY THREAT THE REGION OF SOUTHEAST EUROPE

Miroslav VALČIĆ^{1*}, Ana VASIĆ², Drago NEDIĆ¹

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

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

*Corresponding author: Miroslav Valčić, miroslaval@mail.com

Summary

The first Faculty of Veterinary Medicine was founded in France (Lyon) in 1762, in order to prevent the cyclical waves of rinderpest at the beginning of the 18th century in Europe. Three centuries later, infectious diseases, including zoonoses, cannot be eradicated in the regions where they appear enzootically, and also their spread is a real threat to distant regions of the world. A special segment of the infectious diseases studies is focused to the group of zoonoses that are transmitted by vectors. There are numerous infectious diseases of animals and humans, with the causative agents that are transmitted by insects and arthropods, and in some cases, vectors appear as real hosts and reservoirs of zoonotic agents. Until two decades ago, the appearance of West Nile fever in regions of the world where this zoonosis was enzootic and endemic (for example, the African continent), did not attract the attention of epizootiologists and epidemiologists. However, this infectious disease has caused a disease in a numerous people in our region over the past twenty years, and in some cases the outcome was fatal. Analogous to the example of West Nile fever, it can be assumed that a greater number of vector-borne zoonoses are practically “knocking on the door” of the Southeastern Europe region. That region can be considered a buffer zone, where there are more or less distant regions to the south and east, where until nowadays “exotic” zoonoses appear enzootically, and from which direction we can expect the penetration of vectors, and the infectious diseases they transmit. The potential for the transmission of vector-borne zoonoses primarily refers to diseases transmitted by insects and arthropods. In the case of insects, a sudden outbreak could be expected, for example, of Rift Valley fever, *Chikungunya* virus infection, Japanese encephalitis or Yellow fever. The fight against such zoonoses should primarily be based on vector control. For some

of these zoonoses, vaccines have already been developed for use in human (e.g. Japanese encephalitis) and veterinary (e.g. West Nile fever) medicine. In the case of zoonoses transmitted by arthropods (Crimean-Congo hemorrhagic fever, tick-borne encephalitis), it is expected that the infection will spread slowly but steadily, whereby diagnostic tests and the application of methods of monitoring the presence in animal species that can be indicators of the disease are of more importance. The paper presents the basic mechanisms in the transmission of vector-borne zoonoses as well as certain infectious diseases transmitted by insects and arthropods, which have a significant potential to threaten the region of Southern and Eastern Europe.

Key words: Epizootiology, vector infections, arboviruses.

INTRODUCTION

Vectors, in the broader sense of the term, mean living carriers of infectious diseases in populations of susceptible vertebrate species. That is the epizootiological (epidemiological) interpretation of the term. However, of greater importance is the definition of vector in the narrower sense that refers to insects and arthropods as carriers of viruses, bacteria and protozoa. They are most often insects of the *Diptera* order, which includes mosquitoes (*Culicidae*), sand flies (*Psychodidae*) and hematophagous flies (*Ceratopogonidae*). In some cases, black flies (*Simuliidae*) can also serve as carriers of diseases. In addition to insects, as vectors in the epizootic and epidemiological sense, acarinae, subclass *Acari*, class *Arachnida*, i.e. ticks are of great importance. The vast majority of infectious diseases that are transmitted by vectors (vector infections) are caused by viruses that, due to the fact that they are transmitted by arthropods, are classified in the so-called Arbovirus group (Arboviruses: Arthropod-borne viruses) (Tsai and Chandler, 2007). These viruses can be transmitted vertically, in vector populations. However, in most cases their maintenance in nature depends on horizontal transmission between vertebrates, via vectors. Hence, it can be said that arboviruses are significantly different from other viruses whose maintenance in nature depends only on direct transmission in the population of a susceptible species.

Arboviruses consists of over 500 viruses, of which over 100 can infect humans, and over 40 types of viruses cause infection in animals, but the list is not final (Karabastos, 1985). The most important arboviruses that infect humans and animals belong to the RNA viruses in the families: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridar*, *Reoviridae* and *Rhabdoviridae*. Only one DNA virus belongs to arboviruses, and it is the causative agent of African swine fever (*Asfarviridae*). The high prevalence of

RNA viruses in the group of arboviruses is explained by the characteristics of the genetic material. Namely, the RNA genome varies significantly and is able to adapt to different replicative conditions and mechanisms that prevail in hosts that are phylogenetically and oncogenetically very distant, such as vertebrates and vectors (Beaty et al., 1988).

Human arboviruses are classified according to disease characteristics: systemic febrile diseases, encephalitis, and hemorrhagic fevers. In veterinary medicine, arboviruses cause diseases with multiple symptoms and forms, but even in this case encephalitis and hemorrhagic syndromes are the most common (Bres, 1988).

In relation to the type of vector, it can be said that most arboviruses transmitted by ticks cause encephalitis. The most important viruses of this category that cause epidemics and epizootics are togaviruses, alphaviruses, flaviviruses and bunjaviruses. The first virus for which vector transmission was proven in the 17th century was the cause of Yellow fever. It is a disease that still appears today (South America and Africa) in the form of sporadic and seasonal epidemics despite the existence of effective vector control measures (mosquitoes) and an effective attenuated vaccine (Ludwig and Iacono-Connors, 1993). Dengue, a vector-borne zoonosis that was first mentioned in 1907, still causes illness in hundreds of thousands of people in tropical regions (Monk, 1994). Venezuelan equine encephalitis has caused mass encephalitis in horses and humans from the 1920s to the present day (Rico-Hesse et al., 1995), despite the existence of an effective vaccine for horses. Ross River virus causes epidemics of arthritis infecting up to 68% of the human population on some islands of the Pacific region (Walton and Grayson, 1988). Compared to alphaviruses and flaviviruses, most bunjaviruses cause mild infectious diseases in humans. However, the virus that causes Rift Valley fever causes severe disease in animals and humans with a high mortality rate. Historical data indicate that this virus appeared in Africa after 12 years of “rest” causing epizootics and epidemics (Arthur et al., 1993). The above data indicate that arboviruses will continue to appear in the future as the cause of vector-borne zoonoses, which certainly emphasizes the need for further research into the characteristics of the disease “*per se*” as well as the mechanisms of these infectious diseases in general.

Cycles of infections caused by arboviruses

These are the cycles thanks to which arboviruses are maintained in nature, infecting vertebrates (hosts) and vectors (hematophagous insects and arthropods). Mostly, vectors are from the group of mosquitoes. Less common vectors are ticks (*Argas*)

and sandflies (*Phlebotomus spp*), where there is a close connection between the causative agent (virus) and the vector. Moreover, in some cases it is thought that vectors are actually the hosts of viruses. At the same time, different vectors (mosquitoes) can serve as vectors of the same virus to different vertebrates depending on individual geographical and ecological situations. Most often, vertebrates, especially humans, appear as a “dead end”, in the role of intermediate hosts (Tsai and Chandler, 2007). The epizootiology (and epidemiology) of arbovirus infections is influenced by numerous and often mutually independent factors such as the number and immune status of the species, i.e. vertebrate (host) that serves as a reservoir of a given arbovirus in nature, climatic conditions on which vector reproduction depends. In the complex cycle of maintenance of arboviruses in nature, different species of mosquitoes participate with variable affinity towards different species of vertebrates on which they feed, with frequent host changes. The seasonal increase in the incidence of infections depends on the conditions of vector reproduction and their survival. In the case when a new arbovirus is introduced into a uninfected region of the world with a continental climate, the question arises of the vector’s survival during the winter, but also the possibility of overwintering new local vector species to which the given virus can adapt.

Of key importance for understanding arboviral infections is knowing whether the vector, in which the virus maintenance cycle, also appears as a reservoir, i.e. whether the virus is transmitted trans-stage and transovarially within the vector population. *Bunyavirus*, for example, directly depends on viral gene expression and host metabolic activities. The vector’s meals in the form of a drop of blood activate cellular genes in the ovary of the vector (female mosquito), which simultaneously stimulates virus replication. At the same time, during the period of diapause (egg hibernation) of the vector, it is possible to demonstrate the expression of viral genes whereby almost the entire mechanism of replication is used for the viral mRNA. At the end of diapause, the replication mechanisms of the cells are fully utilized for viral mRNA (Dobie et al., 1997). This unique way of virus expression and recombination at the inter and intramolecular level is particularly significant if the eggs of the vector are infected with two different bunya viruses. In that case, the mechanisms of recombination and reassortment create new variants of the virus.

In the event that the causative agent of an infectious disease is transmitted by ticks, we have to remember that the period of time for development into an adult form (from egg to larva and nymph) is over two years (in continental climate conditions). At each of these stages, the vector needs a meal in the form of a drop of blood, with arbovirus transmission occurring at each feeding. Tick population density depends not only on climatic factors during a given season but also during previous years.

Sometimes, completely different viruses use the same maintenance cycles in nature that are common to vertebrates i.e. reservoirs of viruses and vectors. In that case, as a result, a close epizootiological relationship can appear, so for example, the causative agent of western equine encephalitis (alphavirus) and the causative agent of *St. Louis* encephalitis (flavivirus), spread by the same epizootic cycle in which wild birds and mosquitoes (*Culex tarsalis*) are participants. In nature, both diseases occur simultaneously. A similar association exists in Africa and Asia between Sindbis virus (alphavirus) and West Nile virus (flavivirus), both viruses using an epizootic cycle in which birds are reservoirs and insects (*Culex univittatus*) are vectors. The urban cycle of Yellow fever, dengue and *Chikungunya* fever depends on the mosquito vector *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Likewise, the *Ixodes ricinus* tick transmits the virus that causes tick-borne encephalitis, but also the causative agent of Lyme disease (*Borrelia burgdorferi*). The tick *Dermacentor marginatus* transmits Q fever (*Coxiella burnetii*) as well as viruses causing eastern and western encephalitis (Porterfield, 1995). The simultaneous presence of bacteria and viruses in the same vector can be harmful to the virus, but at the same time it can be one of the methods of vector control. It was established that the mosquito *Aedes aegypti*, if infected with an intracellular bacterium (strain *wMel* isolated from *Drosophila melanogaster*), loses its ability to transmit the causative agent of dengue fever.

Numerous studies are being conducted worldwide, with the aim to clarify the epizootiological cycles of the maintenance of certain vector-borne zoonoses (Tsai and Chandler, 2007). For example, it has recently been established that there are sylvatic cycles in the case of arbovirus infections (dengue fever, dengue hemorrhagic fever and sandfly fever) which involve the multiplication of the virus in wild rainforest rodents, transmission by vectors (mosquitoes) on the one hand, and the “urban” cycle (man-mosquito-man). Apparently the “urban” cycle is not related to the “sylvatic” one because in humans there is a viremia of sufficient intensity and duration to maintain the virus in the vector and human population. However, there is certainly also the possibility that the “sylvatic” cycle is necessary as a reservoir of viruses in nature.

In the case of Rift Valley fever, there is no “sylvatic” cycle. Several species of mosquitoes (*Aedes*) transmit the virus both vertically and trans-stage. Mosquitoes lay infected eggs in flooded areas, so the virus survives for a long period of time (during drought for years). Upon reflooding, new generations of vectors hatch and a new cycle of epizootics occurs, whereby the virus multiplies in susceptible vertebrates (sheep, goats, cattle and humans) (Anyamba et al., 2009).

The global spread of arbovirus infections, most of which are zoonoses, has surprised epizootiologists and epidemiologists in the past few decades. Examples of this are

the spread of West Nile fever in Europe and North America (Nash et al., 2001) as well as Rift Valley fever in the Middle East region (Saudi Arabia). The persistence of an imported West Nile fever epizootic in the US is not conditioned by the presence of *St. Louis* encephalitis (an endemic zoonosis in North America). In contrast, the spread of Japanese encephalitis in Australia was probably prevented or at least slowed because wild pigs on that continent possess neutralizing antibodies specific for the causative agent of *Murray Valley* fever, a virus that is antigenically similar to the virus that causes Japanese encephalitis as well as *Kunjin* virus (Mackenzie, 1999).

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever

The disease, which was first described in 1944 in Crimea, is of viral etiology. The causative agent is a virus from the Bunyavirus family, genus Nairovirus, which is transmitted by ticks. It also appears in Serbia, the surrounding countries, Russia, Turkey, China and in most countries of the Near and Far East (Leblebicioglu, 2010). It is also registered in Australia and South Africa. In endemic and enzootic regions, humans and domestic animals (cattle, sheep, goats and camels) are infected. Reservoirs of the virus are horses, hedgehogs and rodents, and the virus has been isolated from more than 30 species of ticks (*Hyalomma*, *Ixodes*) in which transovarial and trans-stage transmission has been demonstrated (Flick and Whitehouse, 2005). However, the tick-vertebrate cycle is necessary to maintain the virus in nature. The spatial distribution of the disease largely coincides with the distribution of the *Hyalomma* tick. The disease can be spread by infected animals (cattle, camels). The sources of infection are diseased animals that infect ticks, and human can be infected by the consumption of contaminated meat (ostriches). Transmission of Crimean-Congo fever is through vectors (ticks) or contact with infected animals. Manipulation with animals and their meat is also a risk, and the possibility of an aerogenous way of infecting workers in laboratories is not excluded.

After about a week of incubation, the first symptom in humans is an increase in body temperature, weakness, shivering, pain in the head, limbs and back. A common symptom is vomiting. The skin on the face and neck is red and swollen. After 4 - 5 days, hemorrhages are observed in the form of petechiae on the skin of the whole body, mucous membranes and blood in feces and urine appears. The lethality is from 30 to 50% and is higher in the case of severe bleeding (Tsai and Chandler, 2003). The diagnosis is based on the epidemiological anamnesis, in which case attention should be paid to the presence of ticks as well as on the work with animals. The antigen of the virus can be proven by the method of polymerase chain reaction (PCR) or indirectly, by proving seroconversion (IgM). Differential

diagnosis includes septic conditions, leptospirosis, borreliosis, malaria, dengue or rickettsiosis (typhoid).

Sick persons are treated in intensive care units and with strict isolation measures, and in addition to non-specific therapy which aim is to increase the general resistance of the organism, antiviral therapy is also applied (Soares-Weiser et al., 2010). In Russia, an inactivated vaccine is used, and from non-specific prophylaxis measures, it is necessary to pay attention to the possibility of transmission of infection during contact with sick people or animals (cattle, sheep, goats and camels). Special care must be taken during the processing of tissue samples in the laboratory.

Central and Eastern European Tick-borne Encephalitis

Flaviviruses which cause encephalitis are transmitted by ticks and have been known for a long time. Their prevalence often affects the naming of the causative agents themselves. Namely, in the region of Europe, it has long been known that there are viruses causing the so-called Central and Eastern European tick-borne encephalitis (Heyman et al., 2010).

The most important reservoirs of the virus causing Central and Eastern European tick-borne encephalitis are wild rodents (shrews, moles), and viremia of sufficient intensity can develop in wild (deer, hedgehog) and domestic animals (sheep, goats, cattle and dogs). Viremia in natural reservoir species is a necessary condition for the distribution of European encephalitis in a region (Kaiser, 2008). Recently, it has been proven that viruses can also multiply in bats and waterfowl.

Both viruses are transmitted by ticks, namely *Ixodes Ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor marginatus*, *D. silvarum* as well as some species of *Haemaphysalis*. Most often, ticks in the nymph stage are infected by feeding on viremic hosts, vertebrates. Once infected, ticks transmit the infection to the next generation, whereby each developmental form of the parasite is infectious, i.e. when feed on the host (vertebrate) it may transmit the causative agents of Central and Eastern European tick-borne encephalitis. Transmission between an infected individual (and person) and a susceptible one is not possible. Ticks are not only vectors of the virus but also serve as its reservoirs. Viruses are transmitted in ticks transovarially and trans-stage. In Europe, cases of tick-borne encephalitis appear during the period of May and June (Central European tick-borne encephalitis) and in spring and autumn (Eastern European tick-borne encephalitis). Central European tick-borne encephalitis can also be transmitted to humans through milk and unpasteurized milk products, and infections of laboratory workers have also been reported (Lasala and Holbrook, 2010).

The clinical signs in humans are dominated by symptoms of the central nervous system damage, and as with other flavivirus infections, the rise in body temperature is biphasic. People who spend time outside (livestock farmers, forest workers) are especially at risk. Up to 30% of infected people have severe symptoms in the form of a biphasic increase in body temperature. Symptoms are less common in children. After the first increase in body temperature, there is a period without symptoms. Meningoencephalitis is followed by a second phase of body temperature increase during which there are non-specific symptoms that resemble those of the flu (joint pain, headache, gastrointestinal disturbances). In more severe cases, there are meningitis, encephalitis, severe headaches, paresis and paralysis. The degree of lethality is lower in Central European encephalitis (1-5%) compared to the Eastern European type (up to 20%), and in general it is lower in children (Logar et al., 2000).

The diagnosis of tick-borne encephalitis is complex and primarily refers to monitoring the occurrence in susceptible animal species as well as knowledge of the epizootic situation in terms of the season of vector activity or the consumption of uncooked milk. Finding dead wild animals, which could serve as virus reservoirs, can be of importance. Direct confirmation of the virus is difficult, given that the virus is in circulation for a relatively short period of time and when there are no symptoms. On the other hand, the virus can be confirmed in brain tissue, which certainly complicates diagnostic procedures. Confirmation of the European tick-borne encephalitis virus is performed by cell culture isolation methods (neutralization test) and confirmation of the virus genome by polymerase chain reaction. Seroconversion (IgM) is confirmed by immunoenzymatic methods (Martin et al., 2001). Differential diagnosis includes influenza, mumps, enteroviruses, as well as encephalitis of other etiologies.

Treatment of European tick-borne encephalitis is reduced to maintaining the homeostasis of patients. Specific immunoprophylaxis exists, inactivated vaccines are applied. However, vaccines must not be given after exposure to the virus. The same applies to the use of hyperimmune serums in humans. Vaccination is used in persons who are at higher risk (forest workers, livestock farmers) who live in regions where tick-borne encephalitis is endemic (Rendi-Wagner, 2008). The antigen in the vaccine is inactivated, and after the first immunization, which involves the application of three doses (0, 7 and 21 days), a booster is performed 1 to 3 years later (Rendi-Wagner, 2006). Vaccination after exposure is contraindicated (Bröker and Kollaritsch, 2008). Non-specific prophylaxis refers to preventing the consumption of uncooked (and unpasteurized) milk, especially from sheep and goats, as well as preventing contact with ticks by wearing adequate clothing and footwear.

In the Republic of Serbia, the diagnosis of tick-borne encephalitis was initially

based on the results of serological tests of human serum, collected in the period from 1962 to 1969. Out of a total of 1726 sera, positive were from 1.1% (Srem) to 52.6% (Sandžak) (Petrović et al., 2018). Using PCR in 2014 and 2015, the virus was detected in ticks (*Ixodes ricinus*) that were collected on the territory of Fruška Gora and Belgrade (Potkonjak et al., 2017). Tests performed on animals indicate the presence of specific antibodies in the sera of dogs, horses, wild boars, cattle and deer, and in 2017, the presence of the virus in horses in the vicinity of Požarevac was confirmed (Živojinović et al., 2017).

Rift Valley Fever

The Rift Valley stretches across great part of East Africa, encompassing an area almost the size of Europe. Enzootic and endemic, a viral, vector-borne zoonosis appears in this region, accompanying epizootics in sheep, goat and cattle populations. The causative agent belongs to the Bunyavirus family, genus Phlebovirus despite the fact that it is not transmitted by sandflies but by mosquitoes. The disease has been registered in more than 30 countries, and the incidence is associated with rainy periods in regions south of the Sahara. The virus is constantly present in Kenya, Uganda, Namibia, Angola and Nigeria, and recently epizootics were recorded in Egypt (1993) and Madagascar (Jost et al., 2010). The last epizootic outside the endemic region was recorded in Saudi Arabia and Yemen in 2000 (Gerdes, 2004). Reservoirs of the virus and species for its reproduction in nature are sheep, goats, cattle, buffaloes and camels. The virus can be transmitted by over 40 species of mosquitoes, and based on this fact, it is considered that there is a high risk of global distribution of Rift Valley fever. Pandemics are also possible due to the fact that the virus that causes Rift Valley fever is not specific to only one type of vector (mosquito). In previously “free” regions, the virus is most often introduced by infected animals, mostly sheep (Anyamba et al., 2009). In populations of susceptible species, the virus is transmitted by vectors (*Stegomyia* and *Culex* species). People can be infected in the same way, however, people who are in contact with contaminated meat (slaughterhouse workers) and veterinarians are more often at risk. The virus is transmitted transovarially in vectors, and *Stegomyia* mosquitoes also serve as reservoirs of the causative agent in nature. Infected female mosquitoes lay infected eggs which, when dried, can survive for a long period of time (years). The epizootic begins after the next rainy season, when new generations of mosquitoes hatch from the eggs. In addition to this biological way of transmitting the virus, the possibility of mechanical transmission through flies, mosquitoes and other hematophagous insects has also been proven.

Pregnant sheep and goats are particularly susceptible to infection. In addition to abortions, hepatitis and encephalitis are observed, and mortality is higher in younger animals. Clinically, the disease in humans begins with an increase in body temperature, weakness, stiffness, muscle and back pain, skin rash (maculopapular rash), and these symptoms are accompanied with gastrointestinal disturbances. Most often, a person recovers within 2 to 7 days. However, in 1-3% of patients, there are hemorrhages and kidney failure, in which case the mortality is up to 50%. About a month after the first acute symptoms, encephalitis, headache, spasms, symptoms of damage to the central nervous system and coma are found in these patients (Kahlon et al., 2010). The most common side effect is blindness as a result of retinal damage (Al-Hazmi et al., 2005). Out of a total of 140 cases of the disease in Saudi Arabia and Yemen (in 2000), the fatality rate was 19%, and it is believed that a significant number of milder cases were not reported. In most cases, people were infected through contact with animals, in addition to the fact that they were all in contact with mosquitoes (*Stegomia* and *Culex*). Complications were in the form of retinitis, hepatitis, kidney failure, hemorrhages and encephalitis.

The diagnosis of Rift Valley fever is based on epizootiological and epidemiological history. Rift Valley fever should be suspected if there are frequent abortions in sheep and cattle, the death of lambs and calves, and the death of pregnant sheep and cattle. During the acute phase of the disease, the virus can be isolated from the circulation, in the laboratory using the cell culture method or by confirming the viral genome, using the polymerase chain reaction (Sall et al., 2001). During the convalescence phase, serological reactions can prove seroconversion. In the case of encephalitis, IgM antibodies can also be demonstrated in the cerebrospinal fluid. Hemorrhagic diseases, encephalitis and, in animals, abortions come into consideration in the differential diagnosis.

In terms of therapy, interferon and specific anti-viral serum can be applied to sick people (Bouloy and Flick, 2009). Success has also been observed with the use of antiviral drugs (ribavirin).

There is a specific prophylaxis for sheep. Both an inactivated (cattle) and a vaccine in which the immunogen is a live, attenuated (sheep) virus are used. Both vaccines can be used in humans, but their application is currently limited (LaBeud et al., 2010). The best way to control Rift Valley fever is immunization of susceptible species of animals (sheep and cattle), vector control and application of animal hygiene measures in slaughterhouses and during the manipulation of potentially infected animals (slaughterhouses, animal marking, assistance with birth, etc.).

Chikungunya

It is a vector-borne zoonosis that occurs in Africa and Asia (south and southeast). The main symptoms are pain in the joints and a macopapular rash on the skin. In birds (reservoirs), symptoms are absent. The causative agent is Togavirus (alpha), and the disease is endemic (and enzootic) in all regions south of the Sahara, as well as in South and Southeast Asia. Recently, the disease was also registered in South America, and in 2007, the disease also appeared in Italy (Liumbruno et al., 2008). The risk of transmission of *Chikungunya* infections in Europe exists, especially as a result of global changes in climate conditions on the one hand and intensive and rapid transport of potential carriers on the other (Gould and Higgs, 2009; Pistone et al., 2009).

Reservoirs in nature are wild primates, bats and birds, and in addition to the urban cycle (man-vector-man) there is also a rural or sylvatic one. Transmission of the *Chikungunya* virus is carried out by vectors, mosquitoes (*Aedes*, or according to the new nomenclature *Stegomyia*), where there is no vertical transmission of the virus in mosquitoes. The main reservoir of the virus are humans who infect mosquitoes. Direct human-to-human transmission has not been recorded. In Italy, the most important virus vector is *Stegomyia albopicta*; earlier name *Aedes albopictus* (Talbalaghi et al., 2010).

Clinically, there is a sudden rise in body temperature and immediately after that severe pain in the joints, so the patient cannot move. There are also myalgias, nausea, headache, nasal discharge and conjunctivitis, photophobia (Borgherini et al., 2007). A macopapular rash on the skin follows 2 to 5 days later, and hemorrhages on the skin can also be observed. The average lethality is 0.4%, and in children 2.8% (Economopoulou et al., 2009). The pain and swelling of the joints can last for weeks, but thereafter the recovery is complete.

In endemic regions of the world, the diagnosis is based on history and viral antigen detection (PCR), and serological diagnosis is not reliable due to the existence of cross-immunity with other alphaviruses. However, confirmation by seroconversion is important given that cross-reactive viruses appear in different regions of the world in relation to *Chikungunya* virus (Grivard et al., 2007).

The therapy is symptomatic, and in cases of severe pain in the joints, it is necessary to use strong analgesics. The use of steroid preparations should be avoided. There is currently no specific prophylaxis in commercial use. Non-specific prophylaxis refers to the prevention of contact with mosquitoes (nets and repellents), and in regions where the *Chikungunya* virus does not appear, it is necessary to exclude the contact of mosquito and viremic persons, since it is necessary to avoid biggening

of the urban cycle through *Stegomyia albopicta* mosquitoes. Particular attention should be paid to the risk of virus introduction through viremic individuals who have been in endemic regions of the world (Chen and Wilson, 2010). In enzootic and endemic regions, vector control in the vicinity of cities is of great importance.

Yellow Fever

Yellow fever is a vector-borne zoonosis of viral etiology (*Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), which is characterized by icterus and an increase in body temperature in primates (and humans). In enzootic and endemic regions of the world, there are parallel urban and sylvatic (jungles of Africa and South America) cycles that overlap each other (Barnett, 2007). Namely, the reservoirs of the virus are monkeys, and within the urban cycle, the virus is transmitted between humans by mosquitoes (Vasilakis and Weaver, 2008).

The disease is endemic in a large part of Africa where over 450 million people live, primarily in large cities. In those regions, there are also several species of reservoirs (monkeys). In South America, the epizootiological and epidemiological characteristics are the same, so there is a great possibility of this zoonosis spreading to other regions of the world (Gardner and Ryman, 2010). Yellow fever is endemic in rural regions, and eradication is thought to be achievable in urban areas through vector control (CDC, 1999). The lethality can be high, even over 55%, and the population of people who live in vicinity of large cities and who live in unhygienic neighborhoods are particularly at risk. Official data (WHO, 2009) indicate that the number of cases is several thousand annually. However, the number of Yellow fever cases worldwide is thought to be a hundred times higher. A significant number of cases, for example in Brazil and Bolivia, could not be linked to the travel of those persons to enzootic and endemic regions, so it can be concluded that there is a potential for foci to appear outside the region where this disease is present. The same applies to regions in Africa, which indicates the possibility of epidemics in urban areas (Mutebi and Barrett, 2002).

Yellow fever does not appear in Asia, which can be explained by the cross-reactivity of the causative agent with the virus that causes Dengue fever, as well as the weaker competence of the vector (*Stegomyia aegypti*). In Africa and South America, Yellow fever and Dengue fever coexist in the same regions (Gubler, 2004). Compared to Northern Hemisphere residents, travelers returning from regions where Yellow fever is endemic are particularly at risk (CDC, 2000; Muñoz et al., 2008).

The vectors of Yellow fever are mosquitoes (*Stegomyia albopicta* and *S. aegypti*).

Clinically, the disease in humans can progress inapparently to severe forms with

a fatal outcome (CDC, 1999). In the case of a mild form, the symptoms resemble the flu. The rise in body temperature is sudden, there is bradycardia, headache, nausea, nosebleeds, muscle pains and pronounced blood vessels of the conjunctiva. Symptoms last relatively short, up to a few days. In severe cases, remissions are observed with the appearance of icterus, vomiting of bloody contents, melena, urogenital bleeding and kidney failure (oliguria and anuria). Fatal outcomes are preceded by delirium and coma. Lethality is from 10 to 50%. The diagnosis of Yellow fever is based on the epidemiological history, symptoms and laboratory findings (albuminuria and prolonged prothrombin time). The virus can be isolated from blood or cerebrospinal fluid during the first febrile phase. The method of cell culture isolation and detection of the viral genome (PCR) is applied. Evidence of seroconversion using an ELISA test is also used, and specific antiviral IgM antibodies can be demonstrated up to two years after recovery. In terms of differential diagnosis, malaria, hemorrhagic form of dengue fever, hemorrhagic fevers (Marburg, Ebola, Crimean-Congo fever), meningitis, leptospirosis, hepatitis and hantavirus infection come into consideration. Treatment of Yellow fever is symptomatic, and especially hemodialysis is used in case of kidney and liver failure.

Specific Yellow fever prophylaxis exists. In particular, vaccines are intended for people who need to travel to endemic regions of the world, as well as for those who travel from those regions to “free” countries. Basically, there are two types of legal regulations. The first type refers to countries in endemic and enzootic affected regions where a certificate of vaccination of persons is required. The second type of regulation involves countries that are “free” from Yellow fever but where there are potential vectors of the virus. In that case, a vaccination certificate is required for those persons who are citizens of countries located in endemically affected regions (countries) or for persons who have previously been in such countries. Two types of live vaccines are used in which the virus is attenuated. Vaccinated persons are protected for a longer period of time. Adverse effects were observed (Oyelami et al., 1994) after vaccination of persons with a damaged immune system (Receveur et al., 2000) as well as persons over 60 years.

Dengue Hemorrhagic Fever

It is the most serious and common zoonosis transmitted by vectors, but the infection is benign. It is believed that over 2 billion people worldwide in over 100 countries are at risk of getting a disease (WHO, 2009), and that annually up to 50 million people are infected (Kyle and Harris, 2008). About 1% of infected people become ill with severe clinical symptoms in the form of dengue hemorrhagic fever and

dengue shock syndrome. It should be noted that the risk of a more severe form of the disease is higher after the second contact with the virus. Namely, during the first contact, severe forms occur in 0.2% of cases. This percentage is 20% with the second infection. Children are especially sensitive. Dengue hemorrhagic fever is the most common vector-borne zoonosis found in tourists who have stayed in endemic regions of the world and who bring the infection into the country, i.e. a region where the virus has not appeared before. The virus that causes dengue fever belongs to flaviviruses.

Dengue fever does not appear (for now) only on the territory of Europe and Antarctica. It is believed that up to 50 million people are ill annually, and the prevalence is particularly high in Brazil (about a million cases in 2010). It is of particular epizootiological and epidemiological importance that vectors (*Stegomyia aegypti* and *S. albopicta*), which are competent vectors of the causative agent of Dengue fever, are found in previously “free” regions and countries (Jansen and Beebe, 2010). Until 2014, cases of the disease in Japan only occurred in people who had previously traveled to endemic regions. However, that year, 20 people were infected by the vector in a park in the central part of Tokyo.

In endemically affected regions (Central and South America, equatorial Africa and northern Australia), the disease in humans is inapparent (CDC, 1999). However, there are regions where a higher percentage of severe forms of the disease occur in the form of hemorrhagic fever and septic syndrome (India, Indonesia, Philippines). In animals (chimpanzees, gibbons and macaque monkeys), viremia is of sufficient intensity and duration to lead to vector infection. The prevalence of monkey infection is particularly high in Africa and Indonesia. Other monkey species are not as good reservoirs (short-term and low-level viremia).

The virus, the causative agent of Dengue fever is transmitted by vectors, mosquitoes (*Stegomyia aegypti*, *S. albopicta* and *S. africana*) (Jansen and Beebe, 2010). These are biological vectors and reservoirs in nature, since the virus is transmitted transovarially to subsequent generations of vectors. The link between the urban and sylvatic cycles of Dengue fever is maintained by *Stegomyia nivea*, a mosquito that feeds on both primates (monkeys) and humans. It is a zoonosis which is limited to the human population within the urban cycle but which can become an epidemic in regions close to the rainforest. The virus, the causative agent of Dengue fever, can also be transmitted by transfusion.

Clinically, after incubation for about a week, there is a sudden increase in body temperature, headache and myalgias, retroorbital and epigastrium pains. In addition, there is nausea, vomiting, inappetence, insomnia and weakness. Sometimes, bleeding is also present (melena, hematuria, epistaxis). It is the first stage of the

disease that lasts for several days. The second stage is characterized by milder symptoms. In more severe cases, hemorrhagic syndrome and septic shock are found when high body temperature, bleeding, liver enlargement and shock are present. It is considered that the more severe form of the disease is a consequence of immunopathogenetic mechanisms, that is, the presence of immune complexes composed of non-neutralizing antibodies and viral antigens (Halstead et al., 2010). This is especially the case when a person is infected with two types of dengue virus (Martina et al., 2009). Antibodies present as a result of the first infection do not neutralize the second type of virus, but form immune complexes with it and initiate productive infection of macrophages via Fc receptors (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Today, it is known that there are six factors that determine the more severe forms of Dengue fever (hemorrhagic fever and septic shock):

1. infection in the presence of non-neutralizing antibodies,
2. if the second virus is of Southeast Asian origin,
3. women more often get sick in a more severe form,
4. the inhabitants of Asia and the Caucasian type of people get sick more often in a more severe form; blacks are less likely to get the disease,
5. children under 15 years of age are most often affected in a more severe form (Jain and Chaturvedi, 2010) and
6. newborns with maternal antibodies to different types of viruses

The diagnosis of Dengue fever is made on the basis of epidemiological history (travel to an endemic region) and clinical symptoms. The virus can be isolated from the circulation, and the finding of blood hypovoluminemia (increased hematocrit) and blood coagulation disorders is also important. The virus can be isolated in cell culture (Teles et al., 2005). Liver, lung, kidney, spleen and lymph node tissue, taken by biopsy, can be used to confirm viral antigen (TFA) or viral genes by polymerase chain reaction (Conceição et al., 2010).

Seroconversion implies the finding of IgM anti-viral antibodies (Schwartz et al., 2000). Flu, hepatitis, leptospirosis, malaria, hemorrhagic fevers (Ebola, Marburg, hantaviruses), rickettsiosis, as well as other vector-borne zoonoses (Chikungunya, Rift) come into consideration in the differential diagnosis. There is no specific therapy for Dengue fever.

Specific prophylaxis consists of the application of a quadrivalent vaccine in which all four types of viruses are attenuated, however, the safety of this preparation has not yet been confirmed (Swaminathan et al., 2010). The same applies to the recombinant vaccine in which the *Theiler 17D* strain of yellow fever virus is found as an immunogen (Miller, 2010; Van Der Most et al., 2000).

The main way to fight Dengue fever is the control of the vector (*S. aegypti*), where

success refers to the prevention of not only Dengue but also *Chikungunya* fever (Chen and Wilson, 2010). Persons traveling to endemic regions of the world (Venezuela, Southeast Asia) are advised to wear appropriate clothing, window screens, and repellents (CDC, 2012). People who have already been infected with dengue virus are especially at risk (WHO, 2009).

Ross River Fever

In Australia and Oceania, the disease is also known as epidemic polyarthritis. The causative agent is Togavirus (Alpha). The incidence of Ross River fever can be predicted on the basis of meteorological data (precipitation and temperature), and in the endemic region, the disease most often appears in the period from January to May (Woodruff, 2006). The seroprevalence in humans was established in those regions where no clinically manifested infections were reported. If it would appear in Europe, epizootics and epidemics would be expected during the period of activity of the vectors, mosquitoes (*Aedes* and *Culex*). In addition to humans, many types of domestic (cattle, sheep, goats, horses, pigs, dogs) and wild (rodents, birds) animals are susceptible (Jacups et al., 2008). The mechanism by which the virus survives the period of mosquito inactivity is still unknown (Kelly-Hope et al., 2004).

In vectors (mosquitoes), the virus is transmitted vertically from one generation of insects to the next, and an urban epidemiological cycle (human-vector-human) is also considered possible.

Of the infected people, 20-30% show symptoms in the form of a slight increase in body temperature, after which there are pains in the joints (hands and feet in particular) which can also swell. Many patients have a maculopapular rash on the body and extremities, and some have petechiae. The disease is a benign, and joint pain disappears within 3 months, however, it can last for years. Ross River fever is a disease in the pathogenesis of which the relationship between macrophages and viruses plays a significant role (Rulli, 2007). Namely, the virus prevents the expression of genes in macrophages, which are responsible for antiviral defense (Linn et al., 1996). The diagnosis is based on the confirmation of virus antigen (PCR) in samples (blood and synovial fluid) as well as on the basis of seroconversion (ELISA). In regions where Ross River fever is an endemic disease, the diagnosis is most often made on the basis of epidemiological data (vector season) and clinical manifestations. Rubella, Lyme Disease, *Chikungunya* virus infection and Rheumatic Fever are considered in differential diagnoses. In most cases, therapy is not required, and if antirheumatic drugs are administered, the use of steroid preparations should be excluded. There is no specific prophylaxis (vaccine).

Usutu viral infection

Although the first isolation of this flavivirus was in the middle of the 20th century (in 1959), the importance of this virus was noticed only when it was isolated from dead red-winged blackbird (Weissenböck et al., 2002), in Austria (in 2001). The disease is transmitted by mosquitoes, and wild birds are reservoirs of the virus in nature. In the wild, the Usutu virus causes severe infections with a high degree of lethality. In Europe, the vectors are *Culex mosquitoes*. In humans, the virus does not cause any symptoms, however, people with other health problems (Cavrini et al., 2009) or those receiving immunosuppressive therapy are at risk. In horses and humans, viremia is not of sufficient intensity for these species to be considered reservoirs. Specific anti-Usutu virus antibodies have been demonstrated in birds in Serbia (Petrović et al., 2013).

Wesselsbron Fever

A flavivirus that is limited to the region of southern and central Africa, causes this fever, which is transmitted to humans by mosquitoes, and the reservoirs are still unknown wild animal species. In addition to Africa, the virus is also present in Asia (Thailand).

The vectors of Wesselsbron fever are mosquitoes (*Aedes* or *Stegomyia species*). Sheep and cattle, within domestic animal species, are susceptible to infection. The virus can reproduce in canids (coyote) and birds (ducks). Mosquitoes, the vectors, become infected by feeding on domestic animals (sheep and cattle). People (veterinarians, livestock farmers) can become infected by contact with contaminated meat and organs of infected animals as well as during work with samples in the laboratory (Diallo et al., 2005).

It is a benign disease that is acute. Symptoms, if they occur, are an increase of body temperature, headache, muscle and joint pain, and rash. A common symptom is swelling of the liver and spleen. In more severe cases, encephalitis (impaired consciousness), visual disturbances and photophobia are found. In sheep, symptoms are similar to those in Rift Valley fever. Pregnant animals miscarry, and in newborn lambs, Wesselsbron fever is a fatal disease. The diagnosis is based on the epidemiological anamnesis, and contact with diseased animals and their organs is important (aborted fetus in sheep). During the febrile phase, the virus can be isolated from blood and throat swabs. Confirmation of the viral genome is performed by the PCR method, and serological analyzes can confirm seroconversion (Johnson et al., 2000). In the differential diagnosis, influenza should be excluded, and in the region where it appears, if there was contact with sheep, also Rift Valley fever should be

excluded. Wesselsbron fever therapy is symptomatic, and prophylaxis is limited to vector control. There is no specific prophylaxis (vaccine).

Murray Valley Encephalitis

Infections with flavivirus, the causative agent of *Murray Valley* encephalitis, are limited (so far) to Australia and New Guinea (Huppatz et al., 2009). By antigen characteristics, this virus is similar to the one that causes West Nile Fever, and antibodies against Japanese Encephalitis neutralize this virus as well.

In the period from 1917 to 1974, eight outbreaks of *Murray Valley* encephalitis were registered in Australia. The outbreaks were during the active season of the vector (mosquito, *Culex annulirostris*), a species that lays its eggs in ponds and small lakes (Broom et al., 2003). As for other regions of the world, there is a possibility of introduction of the virus causing *Murray Valley* encephalitis (Stich et al., 2003). Clinically, it is a serious disease despite the fact that only 0.2% of infected people develop symptoms. The disease begins suddenly with headache, photophobia, anorexia, severe weakness, vomiting, fever and meningitis. In severe cases, after about 2 weeks of severe symptoms, coma and death follow. Paralysis of the motor nerves can lead to difficult swallowing and breathing. During the first epidemics, the mortality was high (60%), and later it was reduced to 20%. In people who have recovered from the disease, permanent consequences often remain in the form of psychological and neurological disorders. Despite the reduced mortality rate, an increase in the percentage of people who have recovered from the disease and who remain with permanent neurological disorders has recently been observed. The diagnosis is made on the basis of epidemiological data, clinical symptoms and laboratory findings. The virus can only be isolated from brain tissue, i.e. post mortem, by polymerase chain reaction (Studdert et al., 2003). Seroconversion (IgM can be confirmed by enzyme-linked immunosorbent assays-ELISA). Encephalitis of other etiologies is considered in the differential diagnosis, especially in people who have traveled to regions of the world where other flaviviruses occur endemically and enzootically. Therapy is symptomatic, and intensive patient care is important. No specific therapy exists. In regions where *Murray Valley* encephalitis is endemic, mosquito control (larvicides and treatment against adult forms of the vector) is carried out.

CONCLUSION

We have witnessed the “overflow” of the coronavirus from the currently insufficiently defined reservoir populations of SARS-CoV-2 to humans over the past three years. Similar epizootiological and epidemiological scenarios, when an infectious disease spreads like wildfire from some region, can also be expected in the case of over 100 arboviruses that circulate in different regions of the world in more or less known natural cycles. Especially, flaviviruses stand out, which are very dynamic in terms of epizootiology and epidemiology. For example, Dengue hemorrhagic fever was almost eradicated in Central America in the 60s and 70s of the 20th century. However, from 1,000 reported cases in 1958 in Africa and Southeast Asia, there were 500,000 cases in 1998, with the disease beginning to reappear in all regions of South and Central America.

All arboviruses (with the exception of African swine fever) have an RNA molecule as genetic material. It is a highly adaptable molecule that not only has the ability to mutate in relation to virulence, but also in relation to the possibility of replication in species that were previously unsusceptible. These are vector species (mosquitoes and arthropods) as well as wild and domestic animals. This simply means that some of the arboviruses, by entering previously “free” regions and continents, can acquire an affinity both for the local vector population and find a new type of reservoir (animal) in nature. In this way, a new epizootiological and epidemiological cycle would be formed in a new location and with new “players”.

It is believed that the spread of a large number of arbovirus infections is a consequence of the change in climatic conditions, meaning global warming and, as a consequence, the conquest of new territories by vectors. Likewise, in large regions of the world, until three decades ago, the pesticide DDT (*dichlordiphenyltrichlorethane*) was used to effectively control vector populations, primarily mosquitoes (*Stegomyia*, *Anopheles*, etc.). As a consequence of the banning of this pesticide, there is a significant increase in the number of vectors globally, which, together with warming, i.e., a higher degree of vector survival, significantly increases the risk of the spread of vector-borne zoonoses.

Veterinary service both in Republic of Serbia and the region, has contributed to the control of coronavirus infections in the past three years, primarily in the diagnostic term. At the same time, specialists in epizootiology significantly influenced the clarification of the principles of spread, control, suppression and eradication of the SARS-CoV-2 pandemic. With their expert knowledge of infectious animal diseases and the lateral approach provided by epizootiology, veterinarians certainly make a significant contribution to the “one health” system, so it can be concluded that there

is a high probability that veterinarians will be the first to notice the appearance of new vector-borne zoonoses in their field.

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

REFERENCES

- Al-Hazmi A., Al-Rajhi A. A., Abboud E. B., Ayoola E. A., Al-Hazmi M., Saadi R., Ahmed N. (2005): Ocular complications of Rift Valley fever outbreak in Saudi Arabia. *Ophthalmology*, 112:313-318.
- Anyamba A., Chretien J-P, Small J., Tucker C. J., Formenty P. B., Richardson J. H., Britch S. C., Schnabel D. C., Erickson R. L., Linthicum K. J. (2009): Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:955-959.
- Arthur R. R., el-Sharkawy M. S, Cope S. E., Botros B. A., Oun S., Morrill J. C., Shope R. E., Hibbs R. G., Darwish M. A., Imam I. Z. (1993): Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *Lancet*, 342(8880):1149-50.
- Barnett E. D. (2007): Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.*, 44:850-856.
- Beaty B. J., Trent D. W., Roehrig J. T. (1988): Virus variation and evolution: mechanisms and epidemiological significance. In *The arboviruses: Epidemiology and ecology*, Vol. I. Ed. Monath T. P. CRC Press, 59-85.
- Borgherini G., Poubeau P., Staikowsky F., Lory M., Le Moullec N., Becquart J. P., Wengling C., Michault A., Paganin F. (2007): Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin Infect Dis.*, 44(11):1401-7.
- Bouloy M., Flick R. (2009): Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antivir. Res.*, 84:101-118.
- Bres P. (1988): Impact of arboviruses on human and animal health. In *The arboviruses: epidemiology and ecology*, Vol. I. Ed. Monath T. P. CRC Press, 1-18.
- Bröker M., Kollaritsch H. (2008): After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine*, 26:863-868.
- Broom A. K., Lindsay M. D. A., Plant A. J., Wright A. E., Condon R. J., Mackenzie J. S. (2002): Epizootic activity of Murray Valley encephalitis virus in an aboriginal community in the southeast Kimberley region of Western Australia: results of cross-sectional and longitudinal serologic studies. *Am J Trop Med*
-

Hyg., 67(3):319-23.

- Cavrini F., Gaibani P., Longo G., Pierro A. M., Rossini G., Bonilauri P., Gerunda G. E., Di Benedetto F., Pasetto A., Girardis M., Dottori M., Landini M. P., Sambri V. (2009): Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.*, 14(50):19448.
- CDC (1999): Candidate viral diseases for elimination or eradication. Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly. Rep., 48:86-90.
- CDC (2000): Fatal yellow fever in a traveler returning from Venezuela, 1999. Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly. Rep., 49:303-305.
- CDC (2012): Health Information for International Travel. Centers for Disease Control and Prevention.
- Chen L. H., Wilson M. E. (2010): Dengue and Chikungunya infections in travelers. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 23:438-444.
- Conceição T. M., Da Poian A. T., Sorgine M. H. F. (2009): A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods.*, 163(1):1-9.
- Diallo M., Nabeth P., Ba K., Sall A. A., Ba Y., Mondo M., Girault L., Abdalahi M. O., Mathiot C. (2005): Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Med Vet Entomol.*, 19(2):119-126.
- Dobie D. K., Blair C. D., Chandler L. J., Rayms-Keller A., McGaw M. M., Wasieloski L. P., Beaty B. J. (1997): Analysis of LaCrosse virus S mRNA 5' termini in infected mosquito cells and *Aedes triseriatus* mosquitoes. *J Virol.*, 71(6):4395-4399.
- Economopoulou A., Dominguez M., Helynck B., Sissoko D., Wichmann O., Quenel P., Germonneau P., Quatresous I. (2009): Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect.*, 137(4):534-41.
- Flick R., Whitehouse C. A. (2005): Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Curr. Mol. Med.*, 5:753-760.
- Gardner C. L., Ryman K. D. (2010): Yellow fever: a reemerging threat. *Clin. Lab. Med.*, 30:237-260.
- Gerdes G. H. (2004): Rift Valley fever. *Rev. Sci. Tech.*, 23:613-623.
- Gould E. A., Higgs S. (2009): Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 103:109-121.
- Grivard P., Le Roux K., Laurent P., Fianu A., Perrau J., Gigan J., Hoarau G., Grondin N., Staikowsky F., Favier F., Michault A. (2007): Molecular and serological

- diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, 55(10):490-4.
- Gubler D. (2004): The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27:319-330.
- Halstead S. B., Mahalingam S., Marovich M. A., Ubol S., Mosser D. M. (2010): Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect. Dis.*, 10(10):712-722.
- Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S. R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A. (2010): A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8(1):33-50.
- Huppertz C., Kelly P. M., Levi C., Dalton C., Williams D., Durrheim D. N. (2009): Encephalitis in Australia, 1979-2006: trends and aetiologies. *Commun Dis Intell Q Rep*, 33(2):192-7.
- Jacups S. J., Whelan P. I., Currie B. J. (2008): Ross River virus and Barmah Forest virus infections: a review of history, ecology, and predictive models, with implications for tropical northern Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(2):283-297.
- Jain A., Chaturvedi U. C. (2010): Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:119-130.
- Jansen C. C., Beebe N. W. (2010): The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.*, 12:272-279.
- Johnson A. J., Martin D. A., Karabatsos N., Roehrig J. T. (2000): Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 38(5):1827-1831.
- Jost C. C., Nzietchueng S., Kihu S., Bett B., Njogu G., Swai E. S., Mariner J. C. (2010): Epidemiological Assessment of the Rift Valley Fever Outbreak in Kenya and Tanzania in 2006 and 2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(2): 65-72.
- Kahlon S. S., Peters C. J., Leduc J., Muchiri E. M., Muiruri S., Njenga M. K., Breiman R. B., White A. C. Jr., King C. H. (2010): Severe Rift Valley fever may present with a characteristic clinical syndrome. *Am J Trop Med Hyg.*, 82(3):371-375.
- Kaiser R. (2008): Tick-borne encephalitis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 22:561-575.
- Karabastos N. (1985): International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1147.
- Kelly-Hope L. A., Purdie D. M., Kay B. H. (2004): Ross River virus disease in Australia, 1886-1998, with analysis of risk factors associated with outbreaks. *J Med Entomol.*, 41(2):133-150.
-

- Kyle J. L., Harris E. (2008): Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62:71-92.
 - LaBeaud A. D., Kazura J. W., King C. H. (2010): Advances in Rift Valley Fever Research: Insights for Disease Prevention. *Curr Opin Infect Dis.*, 23(5):403-408.
 - Lasala P. R., Holbrook M. (2010): Tick-borne flaviviruses. *Clin. Lab. Med.*, 30:221-235.
 - Leblebicioglu H. (2010): Crimean-Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int. J. Antimicrobiol.*, 36(1):S43-S46.
 - Linn M. L., Aaskov J. G., Suhrbier A. (1996): Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J Gen Virol.*, 77 3:407-11.
 - Liumbruno G. M., Calteri D., Petropulacos K., Mattivi A., Claudio P., Macini P., Tomasini I., Zucchelli P., Silvestri A. R., Sambri V., Pupella S., Catalano L., Piccinini V., Calizzani G., Grazzini G. (2008): The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transf.*, 6:199-210.
 - Logar M., Arnez M., Kolbl J., Avsic-Zupanc T., Strle F. (2000): Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection*, 28(2):74-77.
 - Ludwig G. V., Iacono-Connors L. C. (1993): Insect-transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. *In Vitro cell Dev. Bul*, 29A(4):296-309.
 - Mackenzie J. S. (1999): Emerging viral diseases: an Australian perspective. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:1-8.
 - Martin D. A., Muth D. A., Brown T., Johnson A. J., Karabatsos N. and Roehrig J. T. (2000): Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J. Clin. Microbiol.*, 38(5):1823-1826.
 - Martina B. E. E., Koraka P., Osterhaus A. D. M. E. (2009): Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.*, 22(4):564-581.
 - Miller N. (2010): Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 12:31-38.
 - Monah T. P. (1994): Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2395-2400.
 - Muñoz J., Vilella A., Domingo C., Nicolas J. M., Ory F., Corachan M., Tenorio A., Gascon J. (2008): Yellow fever-associated viscerotropic disease in Barcelona, Spain. *J Travel Med.*, 15(3):202-205.
 - Mutebi J. P., Barrett A. D. (2002): The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes Infect.*, 4:1459-1468.
-

- Nash D., Mostashari V., Fine A., Miller J., O'Leary D., Murray K., Huang A., Rosenberg A., Greenberg A., Sherman M., Wong S., Layton M. (2001): The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.*, 344(24):1807-1814.
- Oyelami S. A., Olaleye O. D., Oyejide C. O., Omilabu S. A., Affiliati B. A. F. (1994): Severe post-vaccination reaction to 17D yellow fever vaccine in Nigeria. *Rev Roum Virol.*, 45(1-2):25-30.
- Petrović T., Blazquez A. B., Lupulović D., Lazić G., Escribano-Romero E., Fabijan D., Kapetanov M., Lazić S., Saiz J. (2013): Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill.*, 18(44):1-8.
- Petrović T., Šekler M., Petrić D., Vidanović C., Potkonjak A., Hrnjaković I., Savić C. S., Debeljak Z., Lazić G., Čupina A. I., Lupulović D., Samojlović M., Jurišić A., Petrović A., Ivanović I., Milošević V., Lazić S. (2018): Flaviviruses at the territory of Serbia – present situation and challenges. *Archives of Vet. Medicine*, 11(2):53-70.
- Pistone T., Ezzedine K., Boisvert M., Receveur M-C., Schuffenecker I., Zeller H., Lafon M-E., Fleury H., Malvy D. (2009): Cluster of chikungunya virus infection in travelers returning from Senegal, 2006. *J Travel Med.*, 16(4):286-288.
- Porterfield J. S. (1995): Exotic viral infections. Chapman and Hall Medical.
- Potkonjak A., Petrović T., Ristanović E., Lalić I., Vračar V., Savić S., Turkulov V., Čanak G., Milošević V., Vidanović D., Jurišić A., Petrović A., Petrović V. (2017): Molecular Detection and Serological Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17(12):813-820.
- Receveur M. C., Thiébaud T., Vedy S., Malvy D., Mercié P., Bras M. L. (2000): Yellow fever vaccination of human immunodeficiency virus-infected patients: report of 2 cases. *Clin Infect Dis.*, 31(3):E7-8.
- Rendi-Wagner P. (2006): Persistence of antibodies after vaccination against tick-borne encephalitis. *Int. J. med. Microbiol.*, 296(40):202-207.
- Rendi-Wagner P. (2008): Advances in vaccination against tickborne encephalitis. *Expert Rev. Vacc.*, 7:589-596.
- Rico-Hesse R., Weaver S. C., de Siger J, Medina G., Salas R. A. (1995): Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:5278-5281.
- Rodenhuis-Zybert I. A., Wilschut J., Smit J. M. (2010): Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol. Life Sci.*, 67(16):2773-86.

- Rulli N. E., Melton J., Wilmes A., Gary Ewart G., Mahalingam S. (2007): The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. *Ann N Y Acad Sci.*, 1102:96-108.
- Sall A. A., Thonnon J., Sene O. K., Fall A., Ndiaye M., Baudez B., Mathiot C., Bouloy M. (2001): Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J Virol Methods*, 91(1):85-92.
- Schwartz E., Mileguir F., Grossman Z., Mendelson E. (2000): Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. *J Clin Virol.*, 19(3):169-173.
- Soares-Weiser K., Thomas S., Thomson G., Garner P. (2010): Ribavirin for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systemic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, 10:207.
- Stich A., Günther S., Drosten C., Emmerich P., Dwyer D. E., Hueston L., Hetzel W., Armin Kirschner A., Fleischer K. (2003): Clinical and laboratory findings on the first imported case of Murray Valley encephalitis in Europe. *Clin. Infect. Dis.*, 37:e19-e21.
- Studdert M. J., Azuolas J. K., Vasey J. R., Hall R. A., Ficorilli N., Huang J-A. (2003): Polymerase chain reaction tests for the identification of Ross River, Kunjin and Murray Valley encephalitis virus infections in horses. *Aust. Vet. J.*, 81:76-80.
- Swaminathan S., Batra G., Khanna N. (2010): Dengue vaccines: state of the art. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 20:819-835.
- Talbalaghi A., Moutailler S., Vazeille M., Failloux A-B. (2010): Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med. Vet. Entomol.*, 24:83-87.
- Teles F. R., Prazeres D. M., Lima-Filho L. J. (2005): Trends in dengue diagnosis. *Rev. Med. Virol.*, 15:287-302.
- Tsai T. F., Chandler L. J. (2003): Arboviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Ed. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Tenover F. C., Tenover K. C. ASM Press, 1553-1569.
- Tsai T. F., Chandler L. J. (2007): Arboviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Eds. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Landry M. S., Tenover F. C., Tenover K. C. ASM Press.
- Van Der Most R. G., Murali-Chrisna K., Ahmed R., Strauss J. H. (2000): Chimeric yellow fever/Dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus specific CD8 T-cell response. *J. Virol.*, 74:8094-8101.
- Vasilakis N., Weaver S. C. (2008): The history and evolution of the human dengue emergence. *Adv. Virus Res.*, 72:1-76.

- Walton T. E., Grayson M. A. (1988): Venezuelan equine encephalomyelitis. In *The arboviruses: epidemiology and ecology*, Vol 5. Ed. Monath T. P. CRC Press, 59-85.
- Weissenböck H., Kolodziejek J., Url A., Lussy H., Rebel-Bauder B., Nowotny N. (2002): Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis group, Central Europe. *Emerg Infect Dis*, 8:652–656.
- WHO (2009): Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organisation.
- Woodruff R. E. (2006): Early warning of Ross River virus epidemics: combining surveillance data on climate and mosquitoes. *Epidemiology*, 17:569-575.
- Živojinović M., Stokić Nikolić S., Dobrosavljević I., Lazić M., Radojičić S., Stojanović M., Veljović Lj. i Milićević V. (2017) Tick-borne encephalitis in Serbia. In 28. Counselling of veterinarians of Serbia, Book of Proceedings and Abstracts, 109-113.

Paper received: 16.08.2023.

Paper accepted: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301209S

UDK 616.33-072:631.223.4

Оригинални научни рад

**САВРЕМЕНЕ СТРАТЕГИЈЕ КОНТРОЛЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНИХ
НЕМАТОДА КОД ОВАЦА**

**Филип ШТРБАЦ^{1*}, Слободан КРЊАЈИЋ¹, Драгица СТОЈАНОВИЋ²,
Радомир РАТАЈАЦ³**

¹Универзитет у Београду, Институт за мултидисциплинарна истраживања, Београд,
Србија

²Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад, Србија

³Научни институт за ветеринарство Нови Сад, Нови Сад, Србија

*Коресподентни аутор: Филип Штрбац, filip.strbac@imsi.bg.ac.rs

Сажетак

Гастроинтестиналне нематодe представљају веома значајне паразите домаћих животиња, нарочито код малих преживара. Код оваца обољења најчешће имају субклиничан ток са смањењем телесне масе и производње, а понекад може доћи и до видљивих клиничких симптома попут анорексије, анемије, јаке дијареје и губитка протеина што све заједно може довести и до угинућа. Комерцијални лекови попут бензимидазола и макроцикличних лактона су се деценијама са успехом користили за контролу ових паразита. Међутим, нерационална примена ових лекова је довела до развоја антихелминтичке резистенције, опадања њихове ефикасности и последичних економских губитака који угрожавају одрживост гајења оваца. Поред тога, примена комерцијалних препарата је повезана и са резидуама које остављају у животињским производима и животној средини, а присутан је и раст цене ових препарата. Због тога се активно трага за новијим стратегијама за контролу ових паразита, а у циљу успостављања интегрисаног приступа који подразумева примену више различитих стратегија. Са једне стране, ту спадају стратегије рационалне примене комерцијалних препарата заснованих на рефугији (циљани третмани, циљани селективни третмани), као и комбинација и ротација антихелминтика из различитих хемијских група. Са друге стране, интегрисан приступ подразумева и употребу различитих алтернативних стратегија попут генетске селекције животиња природно отпорних на нематодe, рационалног управљања пашњацима, избалансиране исхране уз допунска хранива, биолошке контроле (употреба гљива, бактерија и слично), развоја вакцина као и употребе ботаничких препарата (биљака и њихових производа попут екстракта и етарских уља). Различита истраживања су доказала ефикасност наведених стратегија у контроли гастроинтестиналних нематода оваца, при чему се најбољи резултати постижу њиховом комбинованом применом. На овај начин је могуће успорити развој

и ширење антихелминтичке резистенције, као и постићи одрживу контрола ових паразита и смањење економских губитака.

Кључне речи: гастроинтестиналне нематодe, овце, антихелминтичка резистенција, рационална примена антихелминтика, алтернативне стратегије, интегрисана контрола.

УВОД – ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНЕ НЕМАТОДЕ И ПРОБЛЕМ АНТИХЕЛМИНТИЧКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Гастроинтестиналне нематодe представљају једну од главних препрека развоју модерног овчарства (Rodrigues и сар., 2022; Bresciani и сар., 2017). Ови паразити су раширени широм света, при чему су родови *Haemonchus*, *Trichostrongylus* и *Bunostomum* карактеристични за топлију климу, а *Teladorsagia*, *Nematodirus* и *Cooperia* за умерени климат (Mekonnen, 2021). Са високом преваленцом у зависности од рода и подручја, присутни су и на простору Републике Србије (Kulišić и сар., 2013; Pavlović и сар., 2017). Обољења која проузрокују код оваца најчешће протичу субклинички уз смањен унос хране, губитак телесне масе и опадање производње млека, меса и вуне (Bosco и сар., 2020). Ипак, у појединим случајевима у зависности од степена инфекције, може се јавити и клинички видљиво обољење са знацима анемије, анорексије, дијареје, великог губитка протеина, анорексије, смањеног имунитета и фертилитета, а код великог оптерећења паразитима и фаталан исход (Giovannelli и сар., 2018; Belecké и сар., 2021). Због тога, ови паразити на различите начине могу довести до економских губитака, што укључује губитке у производњи, трошкове лечења, смањен фертилитет као и угинућа (Szewc и сар., 2021). Као главно средство за контролу гастроинтестиналних нематода код малих преживара су се деценијама користили комерцијални препарати (Bosco и сар., 2020). То укључује лекове из групе бензимидазола као што су албендазол, фенбендазол и триклабендазол, макроцикличних лактона попут ивермектина, моксидектина и еприномектина, као и имидазотиазола чији представници су левамизол и тетрализол (Potârniche и сар., 2021; Vineer и сар., 2020). Међутим, њихова ефикасност све више опада услед развоја антихелминтичке резистенције, која је пријављена код свих класа лекова, угрожавајући здравље и продуктивност животиња у различитим деловима света (Fissiha и Kinde, 2021). Иако се сматра да је резистенција природан феномен који настаје услед ретких мутација (Shalaby, 2013), улога ветеринара се пре свега огледа у брзини њеног развоја и ширења. Тако су главни фактори који доприносе развоја резистенције висока учесталост третмана, профилактички масовни третмани, субдозирање, континурана употреба једног лека и лоше управљање пашњацима (Fissiha и Kinde, 2021; Falzon и сар., 2014; Shalaby, 2013). Додатни

проблем представља и појава сојева отпорних на више група лекова, посебно код *H. contortus*, *T. circumcincta* и *Trichostrongylus* spp., као и чињеница да време потребно да се отпорност развије на нови лек, након његовог увођења на тржиште, према неким проценама сада износи мање од 10 година (Fissiha и Kinde, 2021; Papadopoulos и сар., 2012).

Иако тачне износе није лако одредити, сматра се да годишњи губици услед развоја антихелминтичке резистенције код различитих хелмината на нивоу Европе износе око 38 милиона еура, са тенденцијом пораста услед све већег ширења резистентних популација и појаве поменутих мулти-резистентних сојева (Charlier и сар., 2020; Vineer и сар., 2020). Због тога је детекција и одређивање степена развоја резистенције од изузетног значаја за развој стратегија у циљу њеног сузбијања, а што подразумева примену и стандардизацију различитих *in vitro* тестова попут теста излегања ларви (енг. *egg hatch test*, *EHT*) и теста развоја ларви (енг. *larval development test*, *LDT*), као и *in vivo* тестова попут теста редукција броја јаја нематода у фецесу (енг. *faecal egg count reduction test*, *FECRT*) (Kebede, 2019; Mphahlele и сар., 2019). Такође, с обзиром на учесталост њиховог коришћења у пракси са једне, а имајући у виду захтев потрошача са друге стране, употреба комерцијалних односно синтетских лекова представља све већи изазов и са аспекта резидуа које могу контаминирати прехранбене производе попут меса и млека, као и животну средину (Castagna и сар., 2022; Veerakumari, 2015). На крају, присутан је и проблем све већег раста цена ових препарата попут албендазола и мебендазола на светском тржишту запажен у последњих 10-15 година (Junsoo Lee и сар., 2021).

Из свега наведеног може се закључити да самостална примена комерцијалних лекова у терапији паразитских инфекција представља све мање одрживу опцију. Због тога се новије стратегије базирају на тзв. интегирсаном приступу који подразумева употребу више различитих стратегија у циљу постизања одрживе контроле гастроинтестиналних нематода оваца, базираних на рационалној примени комерцијалних препарата са једне, и коришћење различитих алтернативних опција са друге стране. Циљ овог рада јесте приказ и опис ових стратегија, а које би могле играти значајну улогу у будућим приступима контроле ових паразита.

РАЦИОНАЛНА ПРИМЕНА АНТИХЕЛМИНТИКА

Стратегије засноване на рефугији

Термин рефугија означава проценат популације различитих развојних стадијума паразита на пашњаку или у домаћима који избегне излагање антихелминтицима (Greer и сар., 2020). У пракси, стратегије засноване на рефугији имају за циљ остављање одређеног броја паразита нетретираним,

како би се успорило ширење резистенције. Наиме, приликом стандардног третмана одређеног стада животиња са прописаном дозом, једини паразити који ће преживети јесу управо они резистентни који ће се након тога размножавати и преносити гене резистенције на потомство, док ће они осетљиви бити елиминисани. То фаворизује селекцију опторних паразита и њихово ширење. Због тога примена рефугије нуди могућност остављања одређеног броја осетљивих паразита у популацији, како би се омогућило очување осетљивих алела. На тај начин долази до укрштања резистентних и осетљивих сојева и разблаживања учесталости резистентних генотипова унутар одређене популације паразита (Hodgkinson и сар., 2019).

У различитим литературним наводима (Calvete и сар., 2020; Greer и сар., 2020; Vineer и сар., 2020) се најчешће помињу две основне стратегије засноване на рефугији: циљани третмани (енг. *target treatments*, *TT*) и циљни селективни третмани (енг. *target selective treatments*, *TST*). *TT* означава третирање свих животиња у одређеном стаду на основу процене ризика од паразитизма. Ови третмани се дају у најприкладније време и служе за смањење броја укупних третмана (односно повећање интервала између њих), како би се омогућило осетљивим генотиповима да се успоставе на пашњаку (Kenyon и сар., 2009). Са друге стране, *TST* су још прецизнији и усмерени су на третман само одређених животиња унутар стада, а које заиста захтевају третман услед клиничких симптома или пада у производњи, односно оних који највише контаминирају пашњаке (Calvete и сар., 2020). Уколико се има у виду карактеристика гастроинтестиналних нематода оваца да се унутар једног стада животиња највећи број ових паразита (80%) налази у свега 20-30% домаћина (Bosco и сар., 2020; Kenyon и сар., 2009), третмани давани на овакав начин би заиста могли допринети смањењу броја потребних третмана.

Међутим, и *TT* а поготово *TST* се ослањају на успостављање одређених индикатора који би детерминисали у које време, односно које животиње ће бити третиране. Према Charlier и сар. (2014) и Greer и сар. (2020), у зависности од тога да ли су у питању животиње у порасту или одрасле јединке, за *TT* то могу бити групно бројање јаја у фецесу (енг. *faecal egg count*, *FEC*), пепсиноген у плазми, телесна маса и прираст, ефикасност продукције, производња млека, антитела у млеку и оцена телесне кондиције (*OTK*), а за *TST* индивидуално бројање јаја у фецесу, *FAMACHA* скор, *OTK* (или претходна три наведена у комбинацији), дијареја скор, понашање, фекундитет и др. Када се појединачно говори о наведеним индикаторима, *FEC* изражен у броју јаја по граму фецеса (енг. *eggs per gram*, *EPG*) најдиректније говори о степену инфекције код животиња, при чему се јаја гастроинтестиналних нематода релативно лако детерминишу у односу на јаја других паразита. Међутим, то представља интензивну технику с обзиром да се узорци морају прво послати у лабораторију па потом анализирати (Preston

и сар., 2014; Kenyon и сар., 2009). *FAMACHA* скор је врло добар показатељ и базира се на оцени (1-5) боје коњуктивалне мукозне мембране, како би се проценио степен анемије узрокован нематодама које сисају крв попут *H. contortus*, али је главно ограничење што се последично не може применити на остале нематодe (Kenyon и сар., 2009). *OTK* такође на скали од 1-5, као индикатор општег стања и телесних резерви, је једноставна за примењивање али не постоји генерални консензус око прага за третман (Seoum и сар., 2017). И остали индикатори такође имају предности и недостатке, па се све више говори о њиховој комбиновај примени, нпр. *FEC* (са *EPG*-ем мањим од 750) са *FAMACHA* скором 4 или више или *OTK* 2 или мање, како је и урађено код оваца и коза у влажним тропским условима у Мексику, када је избегнуто 70% непотребних третмана (Soto-Barrientos и сар., 2018; Torres-Acosta и сар., 2014).

Комбинација и ротација антихелминтика

Комбинација антихелминтика подразумева употребу лекова из различитих хемијских група у циљу успоравања развоја резистенције, при чему је интерес за ову стратегију порастао у претходних неколико година (Fissiha и Kinde, 2021). У поређењу са појединачним ефектом антихелминтика, њиховом комбинованом применом добија се синергистички ефекат, што доводи то значајног повећања ефикасности лечења. Примена ове стратегије код гастроинтестиналних нематода оваца је пожељна из два разлога, са једне стране да омогући одрживу контролу нематода у присуству резистенције, а са друге да одложи развој резистенције на одређене активне супстанце код врста код којих још није евидентна (Shalaby, 2013). Комбинација различитих антихелминтика би у пракси могла да поврати ефикасност третмана на фармама, што је и доказано у одређеним истраживањима (Ramos и сар., 2018; Cezar и сар., 2011). Међутим, ова стратегија је делотворна само уколико је ниво резистенције низак, док при високим нивоима вероватно неће довести до жељене ефикасности (Shalaby, 2013). Такође, слично конвенционалним третманима, остаје питање ефекта након дуготрајне примене оваквих комбинација, с обзиром на отпорност нематода на практично све класе антихелминтика доступних данас (Ramos и сар., 2018). Ипак, компјутерски заснован модел је показао да ако се комбинација примењује када се лекови први пут уведу, приметна резистенција се неће развити више од 20 година (Shalaby, 2013).

Као што је раније наведено, коришћење једног лека без ротације током одређеног времена се сматра високим фактором ризика за развој антихелминтичке резистенције, те се ова стратегија може користити за превенцију њеног развоја (Fissiha и Kinde, 2021). Због тога постоје одређене препоруке да се

различите групе лекова смењују на сваке једне до две године, са циљем да се продужи ефикасност сваког од њих и омогућавајући враћање осетљивости код нематода када антихелминтик није у употреби. Међутим, постоје одређене индикације да је овакав приступ ефикасан само када је резистенција у врло раној фази развоја и пре него што се може приметити, када би природна селекција могла да смањи преваленцу резистентних паразита. Имајућу у виду степен развоја отпорности на најчешће употребљаване лекове, бензимидазоле и макроцикличне лактоне, успех ове стратегије је упитан код ових група (Abbott, 2017). Такође, претходно поменути модел је показао да ова стратегија доводи до развоја резистенције у року 15-20 година (Shalaby, 2013).

АЛТЕРНАТИВНЕ СТРАТЕГИЈЕ

Селекција животиња

Узгој оваца са већом отпорношћу према инфекцијама проузрокованим гастроинтестиналним нематодама се сматра обећавајућом стратегијом за смањење употребе антихелминтика (Aguerre и сар., 2018). Наиме, ова резистенција на нематоду код малих преживара има ниску до високу херитабилност (0,01 до 0,54), при чему наследност ове особине указује на потенцијалну генетску добит кроз селекцију. Због тога се сматра да је код оваца могуће манипулисати узгојним линијама како би се произвеле јаке фенотипске разлике (Zvinorova и сар., 2016). Тако је још раније показано да би одабир животиња са најнижим бројем јаја у фецесу могао бити критеријум за селекцију, с обзиром да је *FEC* након испитивања смањен за 69% (Eady и сар., 2003). Такође, степен оптерећења нематодама може варирати и у зависности од расе, као што су показали резултати истраживања Goncalves и сар. (2018), где су Тексел и Санта инес имале нижи *FEC* у поређењу са расама Ил де Франс и Дорпер. Опција је и да се процени генетска корелација између особина које указују на развој тела (нпр. дубина грудног коша) и особина које указују на степен паразитирања и његове последице, при чему би требало користити више различитих индикатора (Torres и сар., 2021). Ипак, приступе генетске контроле је тешко имплементирати у системима малих производних газдинстава услед недостатка вођења евиденције података, а треба имати у виду и техничка и инфраструктурна питања у програмима генетске селекције (мала стада, лоша инфраструктура и сл.), нарочито у ниже развијеним земљама (Zvinorova и сар., 2016).

Управљање пашњаком

Одговарајући менаџмент управљања пашњацима такође представља ефикасан начин контроле гастроинтестиналних нематода, али и других паразита код

преживара (Kumar и сар., 2013). То подразумева примену неколико мањих стратегија са циљем избегавања изложености оваца великој концентрацији паразита која би довела до клинички видљивих обољења и пада у производњи, а да се са друге стране омогући животињама стварање имунитета (Abbott, 2017). У идеалном случају, требало би користити чисте или нове пашњаке, што подразумева оне који нису коришћени 6-12 месеци, пашњаке на којима је уклоњен усев сена или силаже, пашњаке који се ротирају са ратарским културама као и оне који се недавно обновљени обрадом земљишта (Kumar и сар., 2013). Пашњаци би се могли поделити на парцеле, како би се омогућило дуже време пре поновне испаше (Shalaby, 2013). Већа количина животиња на малом простору повећава концентрацију паразита, због чега би требало користити оптималан број јединки по јединици површине (Kumar и сар., 2013). Неке препоруке су 5 оваца, 5-7 коза или 1 крава по 4 м². Такође, препоручљиво је примењивати и комбиновану испашу оваца и крава (не и коза) или ротационо напасање (Abbott, 2017). При томе је потребно редовно пратити травњак како не би дошло до прекомерне испаше и како би се одржао продуктиван пашњак. Стратешка дехелминтизација у рано пролеће или на почетку кишне сезоне у циљу уклањања недавно изниклих ларви пре него што контаминирају пашњак (Shalaby, 2013), као и коришћење зрелих оваца у доброј кондицији након залучења јагњади у циљу смањења нивоа контаминације на пашњацима високог ризика су још неке од стратегија које се препоручују (Abbott, 2017).

Управљање исхраном

Нутритивни статус односно статус ухрањености може утицати на отпорност оваца према гастроинтестиналним нематодама (Basabe и сар., 2009). Због тога, као и имајући у виду чињеницу да су ови паразити интегрисани у ланац исхране код преживара, манипулација исхраном може послужити као алат у борби против њих. Избалансирана исхрана обезбеђује адекватан извор хранљивих материја (попут витамина, минерала и протеина) и прихватљиво оптерећење паразитима, а које дозвољава оптималан ниво продуктивности. Са друге стране, поремећаји у овој равнотежи могу довести до озбиљних инфекција (Torres-Acosta и сар., 2012). Тако, витамини попут оних из А, Д и Б комплекса и минерали попут цинка, гвожђа, кобалта, натријума, калијума и фосфора су веома важни за развој функционалног имунитета против паразита (Kumar и сар., 2013). У одсуству довољних количина ових материја на пашњаку, може се примењивати и допунска исхрана која поред истих садржи и одговарајуће количине протеина, енергије и других макро и микро састојака. На тај начин се може постићи боља отпорност животиња и редуковати употреба комерцијалних лекова (Bresciani и сар., 2017; Torres-Acosta и сар., 2012). Дакле, предности допунске исхране укључују смањење патофизиолошких ефекта паразитизма,

побошану продуктивност али и смањење природних инфекција (животиње једу мање хране са поља па самим тим уносе и мање ларви), као и разблаживање броја јаја нематода у фецесу (иста или мања количина јаја у већој количина фецеса) (Torres-Acosta и сар., 2012). Такође, треба имати у виду и директан или индиректан антихелминтички ефекат појединих супстанци из природних или допунских хранива попут махунарки богатих танином (Bresciani и сар., 2017; Torres-Acosta и сар., 2012; Basabe и сар., 2009).

Биолошка контрола

Стратегије биоконтроле подразумевају употребу природних непријатеља противгастроинтестиналних нематода у циљу смањења броја слободноживећих стадијума на пашњацима (Szewc и сар., 2021). На тај начин се овом методом смањује број инфективних стадијума (L_3) који се ингестијом уносе у организам животиња, а са циљем смањења оптерећености паразитима на прихватљив ниво са аспекта имунитета. Биолошка контрола се може поделити на директну која подразумева коришћење организама који своје дејство испољавају директно на нематоду (гљиве, бактерије али и друге нематоду), и на индиректну што се односи на коришћење организама који својим понашањем доприносе уништавању станишта за паразите (кишне глисте и балегари) (Szewc и сар., 2021; Worku и сар., 2017; Kumar и сар., 2013).

Када је у питању директна биоконтрола, до сада су највише испитане нематофагне гљиве, карниворне врсте из родова *Duddingtonia*, *Arthrobotrys* и *Monacrosporium*. Ове гљиве користе лепљиве замке у циљу хватања нематода, а могу се примењивати у храни у зрну или у облику натријум-алгината. При томе је значајно напоменути да се споре активирају и нападају ларве тек након избацивања путем фецеса, због чега се не очекују штетни ефекти на животињу. Најзначајнији ефекат је до сада показала гљивица *D. flagrans*, 37,6-91,5% у зависности од истраживања (Szewc и сар., 2021). Због тога у Бразлу већ постоји комерцијално доступан препарат на бази ове гљиве, који је показао *in vitro* ефикасност против гастроинтестиналних нематода оваца, али и говеда и коња (Rodrigues и сар., 2022). Даље, неки сојеви бактерије *Bacillus thuringiensis* која производи инсектицидни δ -endotоксин су показали високу *in vitro* ефикасност против адулта *H. contortus*, *T. colubriformis* и *O. circumcincta* (Worku и сар., 2017; Kotze и сар., 2005). За директну биоконтролу се могу користити и неке слободноживеће предаторске нематоду попут *Butlerius butleri* и гриње *Lasioseius penicilliger*, мада треба имати у виду њихов недостатак специфичности. Од осталих организама долазе у обзир и различити вируси, амебе, протозе и др. (Szewc и сар., 2021; Worku и сар., 2017).

Балегари и кишне глисте се хране животињском балегом, те доприносе разграњи фекалних тачака. На тај начин ометају развојни циклус гастроинтестиналних нематода, а током храњења могу и прогутати јаја и ларве. Такође, могу их затрпати у земљиште, посебно балегари приликом формирања и затрпавања куглица. Из земљишта се јаја и ларве неће вратити на површину, те им се на тај начин смањује бројност (Szewc и сар., 2021; Worku и сар., 2017; Kumar и сар., 2013). Позитиван ефекат кишних глиста је доказан још у истраживању Waghorn и сар. (2002), када је њихово присуство смањило број *T. circumcincta* за 63% код оваца.

Развој вакцина

Вакцине се сматрају врло привлачном алтернативном стратегијом за контролу гастроинтестиналних нематода оваца, с обзиром да су еколошки прихватљиве а мало су подложне развоју резистенције од стране нематода. Различита истраживања на овом пољу се спроведена у протекле две деценије, а у циљу идентификације потенцијалних антигена за развој појединачне или рекомбинантне ДНК вакцине (Ehsan и сар., 2020; González и сар., 2019). Код *H. contortus*, значајним се показао интегрални мембрански гликопротеин *H11*, са *in vivo* ефикасношћу од преко 75% (смањење оптерећења паразитима) и 90% (редукција броја јаја нематода у фецесу) (Nisbet и сар., 2016). На бази управо овог антигена у комбинацији са *H-gal-GP* је развијена вакцина која је лиценцирана за употребу у Аустралији, са високим ефектом у *FECRT* (>80%) и високим титром антитела, уз два различита режима исхране (Bassetto и сар., 2018). Такође, вакцинација шест месеци старих јагњади са соматским *rHc23* антигеном је довела до сличне ефикасности против *H. contortus*, при чему су у заштитном одговору изазваном овом вакцином значајну улогу играли и хуморални и ћелијски имуни одговор (González-Sánchez и сар., 2018). Вакцина заснована на осам рекомбинантних антигена идентификованих код *T. circumcincta* се показала ефикасношћу у стимулисању значајних нивоа заштита код јагњади, али и оваца у перипарталном периоду, при чему је запажен смањен *FEC* код вакцинисаних јединки (González и сар., 2019). Ипак, важно је напоменути да генетске варијације и имунорегулаторне карактеристике присутне код гастроинтестиналних нематода ометају развој вакцина, што захтева коришћење напредних молекуларних приступа. Наведене карактеристике такође подразумевају да ће бити врло тешко развити ефективну *pan-species* вакцину, већ да се мора развити вакцина против сваке врсте појединачно, као што су у суштини и показала досадашња истраживања (Britton и сар., 2020; Ehsan и сар., 2020).

Ботаничка контрола

Биљке и њихови производи се од давнина користе у лечењу различитих обољења. Данас је интерес за фитотерапију нагло порастао и у хуманој и у ветеринарској медицини, а једна од најчешће помињаних индикација јесу управо различита паразитска обољења. У том контексту, фитотерапија представља једну од најзначајнијих алтернатива у контроли гастроинтестиналних нематода оваца (Štrbac и сар., 2022a; Borges и Borges, 2016). У пракси, биљке се могу користити целе, њихови поједини делови или производи познати под називом секундарни метаболити (Hussein и El-Anssary, 2017). Класификација ових метаболита није једноставна с обзиром на њихов број и припадност различитим хемијским групама, али се са антихелминтичком активношћу најчешће повезују терпени и њихови деривати терпеноиди, фенилпропаноиди, флавоноиди као и поменути танини (Jamwal и сар., 2018; Hussein и El-Anssary, 2017). Од неких од ових једињења се могу добити различите биљне формулације богатог хемијског састава попут етарских уља или екстракта, а који се могу користити против различитих паразита (Štrbac и сар., 2023). У сваком случају, код животиња се ботанички антихелминтици могу примењивати уносом од стране самих животиња на испаша, брањем биљака за исхрану животиња и давањем у оборима и торовима, као и производњом поменутих биљних производа (Alonso-Diaz и сар., 2010).

Предности употребе ботаничких антихелминтика против гастроинтестиналних нематода су вишеструке. Њихов богат хемијски састав, што укључује једињења из различитих хемијских група са разним механизмима деловања, може допринети високој ефикасности против различитих развојних стадијума паразита, а са друге стране мањој подложности развоју резистенције у поређењу са комерцијалним препаратима (Štrbac и сар., 2023; Borges и Borges, 2016). Тако је доказан *in vitro* и *in vivo* ефекат бројних етарских уља као и биљних екстракта против различитих гастроинтестиналних нематода оваца, а неки од најзначајнијих резултата су добијени за оригано, тимијан, морач, чубар, различите врсте еукалиптуса, менте, лимунских трава и др. (Štrbac и сар., 2022b, Štrbac и сар., 2022c; Andre и сар., 2018), а у појединим испитивањима су се ефикасним показали и њихови поједини изоловани активни састојци попут карвакрола, тимола, анетола, карвона и др. (Katiki и сар., 2017). Даље, њихово природно порекло се често повезује са мањим количинама резидуа у животињским производима попут меса и млека, као и у животној средини (Štrbac и сар., 2023; Veerakumari, 2015). На крају, присутан је и финансијски моменат с обзиром да се у већини случајева биљне формулације повезују са прикладним ценама, нарочито у државама са развијеним биодиверзитетом (Ferreira и сар., 2018).

Ипак, примена ботаничких антихелминтика против гастроинтестиналних нематода још увек није заживела с обзиром на још увек недовољан број испитивања и потврде њихових ефикасности као и безбедности код животиња, иако је број оваквих истраживања у порасту у последњих неколико година (Štrbac и сар., 2022a; Štrbac и сар., 2022c; Andre и сар., 2018). Такође, у досадашњим испитивањима је *in vivo* ефикасност била најчешће нижа у поређењу са комерцијалним препаратима услед различитих фактора који могу утицати на њихову теренску ефикасност, али се на различите начине може превазићи овај проблем укључујући и примену техника инкапсулације, као што је и доказано у различитим истраживањима (Ali и сар., 2021; Mesquita и сар., 2013). У сваком случају, биљни производи с обзиром на бројне наведене предности би се могли са успехом користити у интегрисаним приступима контроле различитих паразита.

ИНТЕГРИСАН ПРИСТУП КОНТРОЛЕ

Имајући у виду све наведено, јасно је да свака од поменутих стратегија, како оних који се односи на рационалну примену комерцијалних препарата, тако и алтернативних, поседује одређене предности и недостатке. Због тога се чини да самостална примена ниједне од наведених стратегија није одржива самостално, већ да би се најбољи ефекат могао постићи интегрисаним приступом односно њиховом комбинованом применом (Szewc и сар., 2021), а примери за то су бројни. Тако је у истраживању Shalaby i sar. (2012) доказано да ивермектин у комбинацији са уљем *Nigela sativa* има бољу ефикасност, посматрану са морфолошког аспекта и ултраструктурних оштећења, против *H. contortus*, али и пантљичаре *Moniezia expansa* и метиља *Fasciola gigantica* у поређењу са његовом самосталном применом. Слично, у истраживањима Marjanović и сар. (2020) и Trailović и сар. (2015), показано је би комбинација карвакрол у комбинацији са лековима агонистима никотин ацетилхолинског рецептора попут имидазотиазола, или лековима агонистима ГАБА рецептора попут авермектина и пиперизана могла имати синергистички ефекат против различитих нематода, с обзиром на резултате добијене на неуромускуларном препарату *Ascaris suum*. Даље, у истраживању Vilela и сар. (2018), испитана је ефекат комбинације пелета на бази нематофагне гљиве *D. flagrans* и левамизол-хидрохлорида (5%) против гастроинтестиналних нематода оваца. Резултати су показали синергистичко дејство наведене комбинације, те је група животиња која је примила оба третмана имала најниже вредности EPG у практично свим временским интервалима посматрања, у поређењу са групом која је примила само хемијски препарат, као и са контролном групом.

Испитана је и комбинована примена више различитих алтернатива попут исхране богате кондензованим танинима и селекције отпорних раса

животиња. Иако није био јасно доказан адитивни или синергистички ефекат ове комбинације, удео од 55% еспарзете у исхрани је довео до значајно нижег *EPG* у поређењу са контролном исхраном (Werne и сар., 2013). У истраживању Vamboi и сар. (2021), испитана је ефекат примене комбинованог напасања јаради и јуница и допунске исхране са крмним тропским травама, на одговор на присуство гастроинтестиналних нематода и производне карактеристике код јаради. Показано је да су обе појединачне стратегије имале позитиван ефекат (*FEC* значајно нижи у групи комбинованог напасања, а запремина ћелија - *PCV*, *OTK* и жива маса у групи која је добијала суплементе), али да би њихова комбинација побољшала производне перформансе животиња. Из свих ових примера је јасно да је број могућих комбинација различитих стратегија за контролу гастроинтестиналних нематода код оваца велики, што пружа различите могућности за проналазак најефектније, најбезбедније и најпрактичније. Ипак задатак није једноставан и захтевна бројна испитивања, али се чини да је то једини начин за одрживу контролу гастроинтестиналних нематода оваца у будућности.

ЗАКЉУЧАК

Стандардна примена комерцијалних препарата у контроли гастроинтестиналних нематода оваца постаје све мање одржив приступ с обзиром на развој резистенције код нематода, као и услед других разлога (резидуе и раст цена). Због тога се у новије време све више ради на дефинисању и развоју нових стратегија, а које се могу сврстати у две групе: рационална примена комерцијалних препарата и увођење различитих алтернативних метода. Свака од стратегија наведених у овом раду из било које од наведених група поседује одређене предности, као што је и доказано у различитим истраживањима. Ипак, имајући у виду и одређена ограничења ових стратегија, чини се да би се најбољи ефекат могао постићи њиховом комбинованом применом. На овај начин би се кроз интегрисану контролу могла постићи одржива контрола гастроинтестиналних нематода оваца, али и других паразита у будућности.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Abbott K. A., Taylor M., Stubbings L. A. (2017): Sustainable worm control strategies for sheep. 4th Ed. A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers, SCOPS, 40.
- Aguerre S., Jacquiet P., Brodier H., Bournazel J. P., Grisez C., Prevot F., Michot L. (2018): Resistance to gastrointestinal nematodes in dairy sheep: Genetic
-

- variability and relevance of artificial infection of nucleus rams to select for resistant ewes on farms. *Veterinary Parasitology*, 256:16-23.
- Ali R., Ahmad N., Mussarat S., Majid A., Alnomasy S. F., Khan S. N. (2021): Nanoparticles as alternatives for the control of *Haemonchus contortus*: A systematic approach to unveil new Anti-haemonchiasis agents. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 8:1-13.
- Alonso-Diaz M. A., Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro C. A., Hoste H. (2010): Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Ruminant Research*, 89(2-3):164-173.
- Andre W. P. P., Ribeiro W. L. C., Oliveira L. M. B., Macedo I. T. F., Rondon F. C. M., Bevilacqua C. M.L. (2018): Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46:1522.
- Bambou J. C., Cei W., Arquet R., Calif V., Bocage B., Mandonnet N., Alexandre G. (2021): Mixed grazing and dietary supplementation improve the response to gastrointestinal nematode parasitism and production performances of goats. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 8:628686.
- Basabe J., Eiras D. F., Romero J. R. (2009): Nutrition and gastrointestinal parasitism in ruminant production. *Archivos de Zootecnia*, 58(R):131-144.
- Bassetto C., Almeida F., Newlands G. F. J., Smith W., Castilhos A., Fernandes S., Siqueira E. (2018): Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. *Veterinary Parasitology*, 264:52-57.
- Beleckė A., Kupčinskas T., Stadalienė I., Hoglund J., Thamsborg S. M., Stuen S., Petkevičius S. (2021): Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63:18.
- Borges D. G. L., Borges F. A. (2016). Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*, 3:e92016
- Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Ianniello D., Paola Maurelli M. (2020): The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasites & Vectors*, 13:457.
- Bresciani K. D. S., Coelho W. M. D., Gomes J. F., de Matos L. S., dos Santos T. R., Suzuki C. T. N., Lima L. G. F. (2017): Aspects of epidemiology and control of gastrointestinal nematodes in sheep and cattle - Approaches for its sustainability. *Revista de Ciencias Agrarias*, 40(3):664-669.
- Britton C., Emery D. L., McNeilly T. N., Nisbet A. J., Stear M. J. (2020): The potential for vaccines against scour worms of small ruminants. *International Journal for Parasitology*, 50(8):533-553.

- Calvete C., Gonzalez J. M., Ferrer L. M., Ramos J. J., Lacasta D., Delgado I., Uriarte J. (2020): Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 277:109018.
- Castagna F., Bava R., Musolino V., Piras C., Cardamone A., Caressi C., Lupia C. (2022): Potential new therapeutic approaches based on Punica granatum fruits compared to synthetic anthelmintics for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in sheep. *Animals*, 12:2883.
- Cezar A. S., Ribas H. O., Pivoto F. L., Sangioni L. A., Vogel F. S. F. (2011): Combination of drugs-parasitic as an alternative for the control of gastrointestinal nematodes multidrug resistant in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31:151-157.
- Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H., Hinney B. (2020): Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182:105103.
- Charlier J., Morgan E. R., Rinaldi L., van Dijk J., Demeler J., Höglund J., Hertzberg H., Van Ranst B., Hendrickx G., Vercruysse J., Kenyon F. (2014): Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Record*, 175(10):250-255.
- Eady S. J., Woolaston R. R., Barger I. A. (2003): Comparison of genetic and non-genetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livestock Production Science*, 81(1):11-23.
- Ehsan M., Hu R. S., Liang Q. L., Hou J. L., Song X., Yan R., Zhu X. Q. (2020): Advances in the development of anti-haemonchus contortus vaccines: Challenges, opportunities, and perspectives. *Vaccines*, 8(3):555.
- Falzon L. C., O'Neill T. J., Menzies P. I., Peregrine A. S., Jones-Bitton A., vanLeeuwen J., Mederos A. (2014): A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(2):388-402.
- Ferreira L. E., Benincasa B. I., Fachin A. L., Contini S. H. T., França S. C., Chagas A. C. S., Beleboni R. O. (2018): Essential oils of Citrus aurantifolia, Anthemis nobile and Lavandula officinalis: In vitro anthelmintic activities against Haemonchus contortus. *Parasites & Vectors*, 11:269.
- Fissiha W., Kinde M. Z. (2021): Anthelmintic resistance and its mechanism: A review. *Infection and Drug resistance*, 14:5403-5410.
- Giovanelli F., Mattellini M., Fichi G., Flamini G., Perrucci S. (2018): In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences*, 5(3):78.
-

- Goncalves T. C., Alencar M. M., Giglioti R., Bilhassi T. B., Oliveira H. N., Rabelo M. D., Esteves S. N. (2018): Resistance of sheep from different genetic groups to gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. *Small Ruminant Research*, 166:7-11.
- González J. F., Hernandez J. N., Machin C., Perez-Hernandez T., Wright H. W., Corripio-Miyar Y., Price D. R. G. (2019): Impacts of breed type and vaccination on *Teladorsagia circumcincta* infection in native sheep in Gran Canaria. *Veterinary Research*, 50(1):29.
- González-Sánchez M. E., Cuquerella M., Alunda J. M. (2018): Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS ONE*, 13(3):e0193118.
- Greer A. W., Van Wyk J. A., Hamie J. C., Byaruhanga C., Kenyon F. (2020): Refugia-Based Strategies for Parasite Control in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1):31-43.
- Hodgkinson J. E., Kaplan R. M., Kenyon F., Morgan E. R., Park A. W., Paterson S., Babayan S. A. (2019): Refugia and anthelmintic resistance: concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10:51-57.
- Hussein R. A., El-Anssary A. A. (2018): Plant secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In *Herbal Medicines*, eds by Builders P.F.
- Jamwal K., Bhattacharya S., Puri S. (2018): Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9:26-38.
- Junsoo Lee M. S., Joo H., Maskery B. A., Alpern J. D., Park C., Weinberg M., Stauffer W. M. (2021): Increases in anti-infective drug prices, subsequent prescribing, and outpatient costs. *JAMA Network Open*, 4(6):e2113963.
- Katiki L. M., Barbieri A. M. E., Araujo R. C., Verissimo C. J., Louvandini H., Ferreira J. F. S. (2017): Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243:47-51.
- Kebede A. (2019): Review on anthelmintic drug resistance nematodes and its methods of detection in Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2(1):1013.
- Kenyon F., Greer A. W., Coles G. C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret J., Berrag B. (2009): The role of target selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164(1):3-11.
- Kotze A. C., Grady J., Gough J. M., Pearson R., Bagnall N. H., Kemp D. H., Akhurst R. J. (2005): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life stages of economically important nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, 35:1013-1022.

- Kulišić Z., Aleksić N., Đorđević M., Gajić B., Tambur Z., Stevanović J., Stanimirović Z. (2013): Prevalencija i intenzitet infekcije gastrointestinalnim nematodama kod ovaca u istočnoj Srbiji. *Acta Veterinaria*, 63(4):429-436.
- Kumar N., Rao T. K. S., Varghese A., Rathor V. S. (2013): Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of Parasitic Diseases*, 37(2):151-157.
- Marjanović Đ. M., Zdravković N., Milovanović M., Trailović J. N., Robertson A. P., Todorović Z., Trailović S. M. (2020): Carvacrol acts as a potent selective antagonist of different types of nicotinic acetylcholine receptors and enhances the effect of monepantel in the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Veterinary Parasitology*, 278:109031.
- Mekonnen G. (2021): A review on gastrointestinal nematodes in ruminants. *Advances in Applied Research*, 12(7):32.
- Mesquita M. D. A., Junior J. B. E. S., Panassol A. M., de Oliveira E. F., Vasconcelos A. L. C. F., de Paula H. C. B., Bevilacqua C. M. L. (2013): Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research*, 112(9):3161-3165.
- Mphahlele M., Molefe N., Tsotetsi-Khambule A., Oriel T. (2019): Anthelmintic resistance in livestock, In *Helminthiasis*. Okwa O.O., editor, IntechOpen.
- Nisbet A. J., Meeusen E. N., González J. F., Piedrafita D. M. (2016): Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. In *Advances in Parasitology*, ed by Gasser R. B., Elsevier, XCIII:353-396.
- Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S. (2012): Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology*, 189(1):85-88.
- Pavlović I., Becskei Z., Ivanović S., Petrović M. P., Savić M., Petrović V. C., Bojkovski J. A. (2017): Biodiversity of helminths of sheep breed in Vojvodina (Northern Serbia). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 74:162-166.
- Potârniche A. V., Mickiewicz M., Olah D., Cerbu C., Spinu M., Hari A., Gyorke A. (2021): First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. *Animals*, 11(10):2761.
- Preston S. J. M., Sandeman M., Gonzales J., Piedrafita D. (2014): Current status of gastrointestinal nematode diagnosis of small ruminants: where are we and where we are going? *Journal of Immunology Research*, 2014:210350.
- Ramos F., Portella L. P., Rodrigues F. D. S., Reginato C. Z., Cezar A. S., Sangioni L. A., Vogel F. S. F. (2018): Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(1):48-52
-

- Rodrigues J. A., Roque F. L., Lima B. A., Filho G. M. S., Oliveira G. S. M., Sousa L. C., Silva A. L. P. (2022): Control of sheep gastrointestinal nematodes on pasture in the tropical semiarid region of Brazil, using Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*). *Tropical Animal Health and Production*, 54(3).
- Seyoum Z. Demessie Y., Bogale B., Melaku A. (2017): Field evaluation of the efficacy of common anthelmintics used in the control of gastrointestinal nematodes of sheep in Dabat district, Northwest Ethiopia. *Irish Veterinary Journal*, 70:18.
- Shalaby H. A. (2013): Anthelmintic resistance; How to overcome it? *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1):18-32.
- Shalaby H. A., Abu El Ezz N. M. T., Farag T. K., Abou-Zeina H. A. A. (2012): In vitro efficacy of a combination of ivermectin and *Nigella sativa* oil against helminth parasites. *Global Veterinara*, 9:465-473.
- Soto-Barrientos N., Chan-Perez I. I., Espana-Espana E., Novelo-Chi L. K., Palma-Avila I., Ceballos-Mendoza A. C., Sarabia-Hernández J. A. (2018): Comparing body condition score and FAMACHA© to identify hair-sheep ewes with high faecal egg counts of gastrointestinal nematodes in farms under hot tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 167:92-99.
- Štrbac F., Bosco A., Maurelli M. P., Ratajac R., Stojanović D., Simin N., Orčić D. (2022b): Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal nematodes in sheep - in vitro and in vivo studies. *Veterinary Sciences*, 9(2):93.
- Štrbac F., Bosco A., Pušić I., Stojanović D., Simin N., Cringoli G., Rinaldi L. (2022a): The use of essential oils against sheep gastrointestinal nematodes. In *Animal Health Perspectives*, eds by Abbas R. Z., Khan A., Liu P., Saleemi M. K., Unique Scientific Publishers, I:86-94.
- Štrbac F., Krnjajić S., Maurelli M. P. M., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Ratajac R. (2022c): A potential anthelmintic phytopharmacological source of *Origanum vulgare* (L.) essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep. *Animals*, 13(1):45.
- Štrbac F., Krnjajić S., Stojanović D., Novakov N., Bosco A., Simin N., Ratajac R. (2023): Botanical control of parasites in veterinary medicine. In *One Health Triad*, eds by Marcelino L. A., Abbas R. Z., Khan A., Younus M., Saeed N. M., Unique Scientific Publishers, III:215-222.
- Szewc M., De Waal T., Zintl A. (2021): Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *Veterinary Journal*, 268:105602.
- Torres T. S., Sena L. S., dos Santos G. V., Filho L. A. S. F., Barbosa B. L., Junior A. D. S., Britto F. B. (2021): Genetic evaluation of sheep for resistance to gastrointestinal nematodes and body size including genomic information. *Animal Bioscience*, 34(4):516-624.

- Torres-Acosta J. F. J., Perez-Cruz M., Canul-Ku H. L., Soto-Barrientos N., Camara-Sarmiento R., Aguilar-Caballero A. J., Lozano-Argáes I. (2014): Building a combined targeted selective treatment scheme against gastrointestinal nematodes in tropical goats. *Small Ruminant Research*, 121(1):27-35.
- Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro C. A., Hoste H., Aguilar-Caballero A. J., Camara-Sarmiento R., Alonso-Díaz M. A. (2012): Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 103(1):28-40.
- Trailović S. M., Marjanović Đ. M., Trailović J. N., Robertson A. P., Martin R. J. (2015): Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology Research*, 114:3059-3068.
- Veerakumari L. (2015): Botanical anthelmintics. *Asian Journal of Science and Technology*, 6:1881-1894.
- Vilela V. L. R., Feitosa T. F., Braga F. R., Vieira V. D., de Lucena S. C., de Araujo J. V. (2018): Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 27(1).
- Vineer H. R., Eric M. R., Hertzberg H., Bartley D. J., Bosco A., Charlier J., Chartier C. (2020): Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27:69.
- Waghorn T. S., Leathwick D. M., Chen L. Y., Gray R. A. J., Skipp R. A. (2002): Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia* (*Teladorsagia*) *circumcincta* in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 104(2):119-129.
- Werne S., Isensee A., Maurer V., Perler E., Drewek A., Heckendorn F. (2013): Integrated control of gastrointestinal nematodes in lambs using a bioactive feed × breed approach. *Veterinary Parasitology*, 198(3-4):298-304.
- Worku E., Kiros A., Asgedom H., Tadesse B. (2017): Alternative control methods of gastrointestinal nematode infections in small ruminants: biological method and use of medicinal plant extracts. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3(2):11-27.
- Zvinorova P. I., Halimani T. E., Muchadeyi F. C., Matika O., Riggio V., Dzama K. (2016): Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes – the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Veterinary Parasitology*, 225:19-28.

Рад примљен: 12.05.2023.

Рад прихваћен: 10.08.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301227S

UDK 616.33-072:631.223.4

Original Scientific Paper

NOVEL STRATEGIES FOR THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN SHEEP

Filip ŠTRBAC^{1*}, Slobodan KRNJAJIĆ¹, Dragica STOJANOVIĆ², Radomir RATAJAC³

¹University of Belgrade, Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade, Serbia

²University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia

³Scientific Veterinary institute Novi Sad, Novi Sad, Serbia

*Corresponding author: Filip Štrbac, filip.strbac@imsi.bg.ac.rs

Summary

Gastrointestinal nematodes are very important parasites of domestic animals, especially in small ruminants. In sheep, diseases usually have a subclinical form with a decrease in body weight and production, and sometimes there can be visible clinical symptoms such as anorexia, anemia, severe diarrhea and protein loss, all of which together can lead to death. Commercial drugs such as benzimidazole and macrocyclic lactones have been successfully used for decades to control these parasites. However, the irrational application of these drugs has led to the development of anthelmintic resistance, a decrease in their effectiveness and consequent economic losses that threaten the sustainability of sheep breeding. In addition, the use of commercial preparations is also associated with the residues in animal products and the environment, and there is also an increase in the price of these preparations. For this reason, novel strategies for controlling of these parasites are actively seeking, with the goal of establishing an integrated approach that involves the application of several different strategies. On the one hand, these include strategies for the rational application of commercial preparations based on refugia (targeted treatments, targeted selective treatments), as well as the combination and rotation of anthelmintics from different chemical groups. On the other hand, an integrated approach implies the use of different alternative strategies such as genetic selection of animals naturally resistant to nematodes, rational management of pastures, balanced nutrition with supplementary nutrients, biological control (use of fungi, bacteria, etc.), development of vaccines as well as the use of botanical preparations (plants and their products such as extracts and essential oils). Various

studies have proven the effectiveness of the mentioned strategies in the control of gastrointestinal nematodes of sheep, whereby the best results are achieved by their combined application. Thus, it is possible to slow down the development and spread of anthelmintic resistance, as well as achieve sustainable control of these parasites and reduce economic losses.

Key words: gastrointestinal nematodes, sheep, anthelmintic resistance, rational application of anthelmintics, alternative strategies, integrated control.

INTRODUCTION - GASTROINTESTINAL NEMATODES AND THE PROBLEM OF ANTIHELMINTIC RESISTANCE

Gastrointestinal nematodes represent one of the main obstacles to the development of modern sheep farming (Rodrigues et al., 2022; Bresciani et al., 2017). These parasites are distributed worldwide, as the genera *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, and *Bunostomum* are characteristic for warmer climates, and *Teladorsagia*, *Nematodirus*, and *Cooperia* are typical for moderate climates (Mekonnen, 2021). With a high prevalence depending on the gender and area, they are also present in the territory of the Republic of Serbia (Kulišić et al., 2013; Pavlović et al., 2017). The diseases they cause in sheep are usually subclinical with reduced feed intake, loss of body weight and decreased production of milk, meat and wool (Bosco et al., 2020). However, in some cases, depending on the degree of infection, a clinically visible disease with signs of anemia, anorexia, diarrhea, large protein loss, anorexia, reduced immunity and fertility can occur, and in the case of a high load of parasites, a fatal outcome occurs (Giovanelli et al., 2018; Belecké et al., 2021). Therefore, these parasites can lead to economic losses in various ways, which include production losses, treatment costs, reduced fertility as well as deaths (Szewc et al., 2021).

Commercial preparations have been used for decades as the main tool for controlling gastrointestinal nematodes in small ruminants (Bosco et al., 2020). These include drugs from the group of benzimidazoles such as albendazole, fenbendazole and triclabendazole, macrocyclic lactones such as ivermectin, moxidectin and eprinomectin, as well as imidazothiazoles whose representatives are levamisole and tetramizole (Potârniche et al., 2021; Vineer et al., 2020). However, their effectiveness is increasingly declining due to the development of anthelmintic resistance, which has been reported in all drug classes, threatening the health and productivity of animals in different parts of the world (Fissiha and Kinde, 2021). Although it is considered that resistance is a natural phenomenon that occurs due to rare mutations (Shalaby, 2013), the role of veterinarians is primarily reflected in the speed of its development and spread. Thus, the main factors that contribute to

the development of resistance are high frequency of treatment, prophylactic mass treatments, underdosing, continuous use of one drug and poor pasture management (Fissiha and Kinde, 2021; Falzon et al., 2014; Shalaby, 2013). An additional problem is the appearance of strains resistant to several groups of drugs, especially in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *Trichostrongylus spp.*, as well as the fact that the time required to develop resistance to a new drug, after its introduction to the market, according to some estimates, is less than 10 years (Fissiha and Kinde, 2021; Papadopoulos et al., 2012).

Although the exact amounts are not easy to determine, it is considered that the annual losses due to the development of anthelmintic resistance in various helminths at the European level is around 38 million euros, with a tendency to increase due to the increasing spread of resistant populations and the appearance of the aforementioned multi-resistant strains (Charlier et al., 2020; Vineer et al., 2020). Therefore, the detection and determination of the degree of development of resistance is extremely important for the development of strategies for its suppression, which implies the application and standardization of various *in vitro* tests such as the egg hatch test (EHT) and the larval development test (LDT), as well as *in vivo* tests such as the fecal egg count reduction test (FECRT) (Kebede, 2019; Mphahlele et al., 2019). Also, considering the frequency of their use in practice on the one hand, and taking into account consumer demand on the other, the use of commercial or synthetic drugs represents an increasing challenge from the aspect of residues that can contaminate food products such as meat and milk, as well as the environment (Castagna et al., 2022; Veerakumari, 2015). Finally, there is also the problem of increasing prices of these preparations such as albendazole and mebendazole on the world market observed in the last 10-15 years (Junsoo Lee et al., 2021).

From all mentioned above, it can be concluded that the independent use of commercial drugs in the treatment of parasitic infections is an increasingly less sustainable option. That is why novel strategies are based on the so-called an integrated approach that implies the use of several different strategies in order to achieve sustainable control of gastrointestinal nematodes of sheep, based on the rational application of commercial preparations on the one hand, and the use of various alternative options on the other hand. The aim of this paper is to present and describe these strategies, which could play a significant role in future approaches to the control of these parasites.

RATIONAL USE OF ANTIHELMINTICS

Strategies based on refugia

The term refugia means the percentage of the population of different developmental stages of the parasite in the pasture or in the households that avoids exposure to anthelmintics (Greer et al., 2020). In practice, refugia-based strategies aim to leave a certain number of parasites untreated, in order to slow down the spread of resistance. Namely, during the standard treatment of a certain herd of animals with the prescribed dose, the only parasites that will survive are the resistant ones that will then reproduce and pass on the resistance genes to the offspring, while the sensitive ones will be eliminated. This favors the selection of resistant parasites and their spread. Therefore, the application of refugia offers the possibility of leaving a certain number of susceptible parasites in the population, in order to allow the preservation of susceptible alleles. In this way, there is a cross between resistant and sensitive strains and a dilution of the frequency of resistant genotypes within a certain parasite population (Hodgkinson et al., 2019).

In various references (Calvete et al., 2020; Greer et al., 2020; Vineer et al., 2020) two basic strategies based on refugia are most often mentioned: *target treatments* (TT) and *target selective treatments* (TST). TT means treating all animals in a particular herd based on an assessment of the risk of parasitism. These treatments are given at the most appropriate time and serve to reduce the number of total treatments (i.e. increase the interval between them) to allow susceptible genotypes to establish in the pasture (Kenyon et al., 2009). On the other hand, TST are even more precise and are aimed at the treatment of only certain animals within the herd, which really require treatment due to clinical symptoms or a decrease in production, i.e. those that contaminate pastures the most (Calvete et al., 2020). If we take into account the characteristics of gastrointestinal nematodes of sheep, that within one herd of animals the largest number of these parasites (80%) is found in only 20-30% of the host (Bosco et al., 2020; Kenyon et al., 2009), treatments given to this way could really contribute to reducing the number of required treatments.

However, both TT and especially TST rely on the establishment of certain indicators that would determine at what time and which animals will be treated. According to Charlier et al. (2014) and Greer et al. (2020), depending on whether it is growing animals or adults, for TT these can be group *faecal egg count* (FEC), pepsinogen in plasma, body weight and growth, efficiency production, milk production, antibodies in milk and body condition score (BCS), and for TST individual egg count in feces, FAMACHA score, BCS (or the previous three listed in combination), diarrhea score, behavior, fecundity, etc. When talking about the mentioned indicators

individually, FEC expressed in the number of *eggs per gram* of faeces (EPG) most directly indicates on the degree of infection in animals, whereby the eggs of gastrointestinal nematodes are relatively easy to determine compared to the eggs of other parasites. However, it is an intensive technique as the samples must first be sent to the laboratory and then analyzed (Preston et al., 2014; Kenyon et al., 2009). The FAMACHA score is a very good indicator and is based on a score (1-5) of the color of the conjunctival mucous membrane, in order to assess the degree of anemia caused by blood-sucking nematodes such as *H. contortus*, but the main limitation is that it consequently cannot be applied to other nematodes (Kenyon et al., 2009). Although BCS, measured on a scale of 1-5, as indicator of general condition and body reserves, is simple to apply, there is no general consensus about the threshold for treatment (Seyoum et al., 2017). The other indicators also have advantages and disadvantages, so there is more and more discussion about their combined application, e.g. FEC (with EPG less than 750) with FAMACHA score 4 or more or BCS 2 or less, as was done in sheep and goats in humid tropical conditions in Mexico, when 70% of unnecessary treatments were avoided (Soto-Barrientos et al., 2018; Torres-Acosta et al., 2014).

Combination and rotation of antihelmintics

The combination of anthelmintics involves the use of drugs from different chemical groups in order to slow down the development of resistance, and interest in this strategy has grown in the past few years (Fissiha and Kinde, 2021). Compared to the individual effect of anthelmintics, their combined use results in a synergistic effect, which leads to a significant increase in treatment efficiency. Application of this strategy in gastrointestinal nematodes of sheep is desirable for two reasons, on the one hand to enable sustainable control of nematodes in the presence of resistance, and on the other hand to delay the development of resistance to certain active substances in species where it is not yet evident (Shalaby, 2013). A combination of different anthelmintics could in practice restore the effectiveness of treatment on farms, which has been proven in certain studies (Ramos et al., 2018; Cezar et al., 2011). However, this strategy is effective only if the level of resistance is low, while at high levels it is unlikely to lead to the desired efficiency (Shalaby, 2013). Also, similar to conventional treatments, the question of the effect after long-term application of such combinations remains, given the resistance of nematodes to practically all classes of anthelmintics available today (Ramos et al., 2018). However, a computer-based model has shown that if the combination is administered when the drugs are first introduced, noticeable resistance will not develop for more than 20 years (Shalaby, 2013).

As previously stated, using one drug without rotation over a period of time is considered a high risk factor for the development of anthelmintic resistance, and this strategy can be used to prevent its development (Fissiha and Kinde, 2021). Therefore, there are certain recommendations to change different groups of drugs every one to two years, with the aim of prolonging the effectiveness of each of them and enabling the return of sensitivity in nematodes when the anthelmintic is not in use. However, there are some indications that this approach is effective only when resistance is at a very early stage of development and before it can be noticed, when natural selection could reduce the prevalence of resistant parasites. Given the degree of development of resistance to the most commonly used drugs, benzimidazoles and macrocyclic lactones, the success of this strategy is questionable in these groups (Abbott, 2017). Also, the previously mentioned model showed that this strategy leads to the development of resistance within 15-20 years (Shalaby, 2013).

ALTERNATIVE STRATEGIES

Selection of animals

Breeding sheep with greater resistance to infections caused by gastrointestinal nematodes is considered a promising strategy to reduce the use of anthelmintics (Aguerre et al., 2018). Namely, resistance to nematodes in small ruminants has low to high heritability (0.01 to 0.54), where the heritability of this feature indicates a potential genetic gain through selection. Therefore, it is considered possible to manipulate breeding lines in sheep in order to produce strong phenotypic differences (Zvinorova et al., 2016). Thus, it was shown earlier that the selection of animals with the lowest number of eggs in feces could be a selection criterion, considering that the FEC was reduced by 69% after the testing (Eady et al., 2003). Also, the degree of nematode burden can vary depending on the breed, as shown by the results of the study done by Goncalves et al. (2018), where Texel and Santa Inés had lower FEC compared to Ile de France and Dorper breeds. There is also an option to assess the genetic correlation between features that indicate body development (e.g. chest depth) and features that indicate the degree of parasitism and its consequences, whereby several different indicators should be used (Torres et al., 2021). However, genetic control approaches are difficult to implement in the systems of small production farms due to the lack of keeping the data record. Also, technical and infrastructural issues in genetic selection programs (small herds, poor infrastructure, etc.) should also be taken into account, especially in less developed countries (Zvinorova et al., 2016).

Pasture management

Adequate pasture management is also an effective way to control gastrointestinal nematodes and other parasites in ruminants (Kumar et al., 2013). This implies the application of several smaller strategies with the aim of avoiding the exposure of sheep to a high concentration of parasites that would lead to clinically visible diseases and a decrease in production, while on the other hand enabling the animals to develop immunity (Abbott, 2017). Ideally, clean or new pastures should be used, meaning those that have not been used for 6-12 months, pastures that have had a crop of hay or silage removed, pastures that are rotated with arable crops, and those that have recently been restored by tillage (Kumar et al., 2013). Pastures could be divided into plots, to allow a longer time before re-grazing (Shalaby, 2013). A larger amount of animals in a small space increases the concentration of parasites, which is why the optimal number of individuals per unit area should be used (Kumar et al., 2013). Some recommendations are 5 sheep, 5-7 goats or 1 cow per 4 m². Also, it is recommended to apply combined grazing of sheep and cows (not goats) or rotational grazing (Abbott, 2017). At the same time, it is necessary to regularly monitor the lawn in order not to overgraze and to maintain a productive pasture. Strategic deworming in early spring or at the beginning of the rainy season to remove newly emerged larvae before they contaminate the pasture (Shalaby, 2013), as well as using mature ewes in good condition after lambing to reduce contamination levels in high-risk pastures are some of the strategies that are also recommended (Abbott, 2017).

Nutrition management

Nutritional status can influence the resistance of sheep to gastrointestinal nematodes (Basabe et al., 2009). For this reason, as well as bearing in mind the fact that these parasites are integrated into the ruminant food chain, dietary manipulation can serve as a tool in the fight against them. A balanced diet provides an adequate source of nutrients (such as vitamins, minerals and proteins) and an acceptable load of parasites, which allows an optimal level of productivity. On the other hand, disturbances in this balance can lead to serious infections (Torres-Acosta et al., 2012). Thus, vitamins such as those from the A, D and B complex and minerals such as zinc, iron, cobalt, sodium, potassium and phosphorus are very important for the development of functional immunity against parasites (Kumar et al., 2013). In the absence of sufficient amounts of these substances in the pasture, supplementary feeding can be applied, which in addition to them also contains adequate amounts of protein, energy and other macro and micro ingredients. In this way, better

animal resistance can be achieved and the use of commercial drugs can be reduced (Bresciani et al., 2017; Torres-Acosta et al., 2012). Therefore, the advantages of supplementary feeding include a reduction in the pathophysiological effects of parasitism, improved productivity, but also a reduction in natural infections (animals eat less food from the field and therefore ingest fewer larvae), as well as dilution of the number of nematode eggs in feces (the same or smaller amount of eggs in a larger amount of feces) (Torres-Acosta et al., 2012). Also, the direct or indirect anthelmintic effect of certain substances from natural or supplementary nutrients such as legumes rich in tannin should be taken into account (Bresciani et al., 2017; Torres-Acosta et al., 2012; Basabe et al., 2009).

Biological control

Biocontrol strategies include the use of natural enemies against gastrointestinal nematodes in order to reduce the number of free-living stages in pastures (Szewc et al., 2021). In this way, this method reduces the number of infectious stages (L_3) that are introduced into the animal's body by ingestion, with the aim of reducing the load of parasites to an acceptable level from the aspect of immunity. Biological control can be divided into direct, which involves the use of organisms that exert their effects directly on nematodes (fungi, bacteria, but also other nematodes), and indirect, which refers to the use of organisms whose behavior contributes to the destruction of habitats for parasites (earthworms and dung beetles) (Szewc et al., 2021; Worku et al., 2017; Kumar et al., 2013).

When it comes to direct biocontrol, nematophagous fungi, carnivorous species from the genera *Duddingtonia*, *Arthrobotrys* and *Monacrosporium* have been investigated the most. These fungi use sticky traps to catch nematodes, and they can be used in grain food or in the form of sodium alginate. It is important to note that the spores are activated and attack the larvae only after they are expelled through feces, which is why no harmful effects on the animal are expected. The most significant effect has so far been shown by the fungus *D. flagrans*, 37.6-91.5% depending on the study (Szewc et al., 2021). For this reason, there is already a commercially available preparation based on this mushroom in Brazil, which has shown *in vitro* effectiveness against gastrointestinal nematodes of sheep, but also cattle and horses (Rodrigues et al., 2022). Furthermore, some strains of *Bacillus thuringiensis* that produce the insecticidal δ -endotoxin have shown high *in vitro* efficacy against adult *H. contortus*, *T. colubriformis* and *O. circumcincta* (Worku et al., 2017; Kotze et al., 2005). Some free-living predatory nematodes such as *Butlerius butleri* and the mite *Lasioseius penicilliger* can also be used for direct biocontrol, although their lack of specificity should be taken into account. Other organisms include various viruses,

amoebas, protozoa, etc. (Szewc et al., 2021; Worku et al., 2017).

Dung beetles and earthworms that eat animal feces, contributing to the destruction of faecal points. In this way, they interfere with the development cycle of gastrointestinal nematodes, and during feeding they can also swallow eggs and larvae. Also, they can be covered in the soil, especially dung beetles when forming and burying the balls. From the soil, the eggs and larvae will not return to the surface, and in this way their numbers are reduced (Szewc et al., 2021; Worku et al., 2017; Kumar et al., 2013). The positive effect of earthworms was already proven in the research by Waghorn et al. (2002), when their presence reduced the number of *T. circumcincta* by 63% in sheep.

Development of vaccines

Vaccines are considered a very attractive alternative strategy for the control of gastrointestinal nematodes in sheep, given that they are environmentally acceptable and less susceptible to the development of resistance by nematodes. Various studies in this field have been conducted in the past two decades, with the aim of identifying potential antigens for the development of a single or recombinant DNA vaccine (Ehsan et al., 2020; González et al., 2019). In *H. contortus*, the integral membrane glycoprotein H11 proved to be significant, with *in vivo* efficiency of over 75% (reduction of parasite load) and 90% (reduction of the number of nematode eggs in feces) (Nisbet et al., 2016). Based on this antigen, in combination with H-gal-GP, a vaccine was developed that is licensed for use in Australia, with a high effect in FECRT (>80%) and a high antibody titer, with two different nutritional regimens (Bassetto et al., 2018). Also, vaccination of six-month-old lambs with the somatic rHc23 antigen led to similar efficacy against *H. contortus*, whereby both humoral and cellular immune responses played a significant role in the protective response induced by this vaccine (González-Sánchez et al., 2018). A vaccine based on eight recombinant antigens identified in *T. circumcincta* was shown to be effective in stimulating significant levels of protection in lambs, but also in sheep in the peripartum period, with reduced FEC observed in vaccinated individuals (González et al., 2019). However, it is important to note that the genetic variations and immunoregulatory characteristics present in gastrointestinal nematodes hinder the development of vaccines, which requires the use of advanced molecular approaches. The aforementioned characteristics also imply that it will be very difficult to develop an effective *panspecies* vaccine, but that a vaccine against each species must be developed individually, as studies has shown (Britton et al., 2020; Ehsan et al., 2020).

Botanical control

Plants and their products have been used in the treatment of various diseases since ancient times. Nowadays, interest in phytotherapy has grown rapidly in both human and veterinary medicine, and one of the most frequently mentioned indications is various parasitic diseases. In this context, phytotherapy represents one of the most significant alternatives in the control of gastrointestinal nematodes in sheep (Štrbac et al., 2022a; Borges and Borges, 2016). In practice, plants can be used as whole, as their individual parts or products known as secondary metabolites (Hussein and El-Anssary, 2017). The classification of these metabolites is not simple considering their number and belonging to different chemical groups, but terpenes and their derivatives terpenoids, phenylpropanoids, flavonoids as well as the mentioned tannins are most often associated with anthelmintic activity (Jamwal et al., 2018; Hussein and El-Anssary, 2017). From some of these compounds, different herbal formulations with a rich chemical composition can be obtained, such as essential oils or extracts, which can be used against various parasites (Štrbac et al., 2023). In any case, in animals, botanical anthelmintics can be applied by intake by the animals themselves on pasture, by picking plants for animal feed and giving them in pens, as well as by producing the mentioned plant products (Alonso-Diaz et al., 2010).

The advantages of using botanical anthelmintics against gastrointestinal nematodes are multiple. Their rich chemical composition, which includes compounds from different chemical groups with various mechanisms of action, can contribute to high efficiency against different developmental stages of parasites, and on the other hand, to a lower susceptibility to the development of resistance compared to commercial preparations (Štrbac et al., 2023; Borges and Borges, 2016). Thus, the *in vitro* and *in vivo* effect of numerous essential oils as well as plant extracts against various gastrointestinal nematodes of sheep has been proven, and some of the most significant results were obtained for oregano, thyme, sea buckthorn, fennel, various types of eucalyptus, mint, lemon grass, etc. (Štrbac et al., 2022b, Štrbac et al., 2022c; Andre et al., 2018), and in some tests, their individual isolated active ingredients such as carvacrol, thymol, anethole, carvone, etc., proved to be effective (Katiki et al., 2017). Furthermore, their natural origin is often associated with smaller amounts of residues in animal products such as meat and milk, as well as in the environment (Štrbac et al., 2023; Veerakumari, 2015). Finally, there is also a financial aspect, given that in most cases herbal formulations are associated with suitable prices, especially in countries with developed biodiversity (Ferreira et al., 2018).

However, the application of botanical anthelmintics against gastrointestinal nematodes has not yet been totally implemented due to the still insufficient number of tests and confirmation of their effectiveness and safety in animals, although the number of such studies has been increasing in the last few years (Štrbac et al., 2022a; Štrbac et al., 2022c; Andre et al., 2018). Also, in previous tests, the *in vivo* efficiency was usually lower compared to commercial preparations due to various factors that can affect their field efficiency, but this problem can be overcome in different ways, including the application of encapsulation techniques, as has been proven in different studies (Ali et al., 2021; Mesquita et al., 2013). In any case, plant products, considering the numerous advantages mentioned, could be successfully used in integrated approaches to the control of different parasites.

INTEGRATED CONTROL APPROACH

Bearing in mind all the above, it is clear that each of the mentioned strategies, both those related to the rational application of commercial preparations and alternative ones, has certain advantages and disadvantages. For this reason, it seems that the independent application of none of the mentioned strategies is sustainable on its own, but that the best effect could be achieved with an integrated approach, i.e. their combined application (Szewc et al., 2021), and there are numerous examples of this. Thus, study done by Shalaby et al. (2012) proved that ivermectin in combination with *Nigella sativa* oil has better efficiency, observed from the morphological aspect and ultrastructural damage, against *H. contortus*, but also the tapeworm *Moniezia expansa* and the fluke *Fasciola gigantica* compared to its independent application. Similarly, in the study done by Marjanović et al. (2020) and Trailović et al. (2015), it was shown that the combination of carvacrol in combination with nicotinic acetylcholine receptor agonist drugs such as imidazothiazole, or GABA receptor agonist drugs such as avermectin and piperizan could have a synergistic effect against various nematodes, considering the results obtained on the neuromuscular preparation of *Ascaris suum*. Furthermore, in the study done by Vilela et al. (2018), the effect of a combination of pellets based on the nematophagous fungus *D. flagrans* and levamisole hydrochloride (5%) against gastrointestinal nematodes of sheep was tested. The results showed a synergistic effect of the mentioned combination, and the group of animals that received both treatments had the lowest EPG values in all time intervals of observation, compared to the group that received only the chemical preparation, as well as to the control group.

The combined application of several different alternatives, such as nutrition rich in condensed tannins and the selection of resistant animal breeds, was tested.

Although the additive or synergistic effect of this combination was not clearly demonstrated, the proportion of 55% sainfoin in the diet led to a significantly lower EPG compared to the control diet (Werne et al., 2013). In the study done by Bambou et al. (2021), the effect of the application of combined grazing of kids and heifers and supplementary feeding with forage tropical grasses on the response to the presence of gastrointestinal nematodes and production characteristics in kids was examined. It was shown that both individual strategies had a positive effect (FEC significantly lower in the group of combined grazing, and cell volume - PCV, BCS and live weight in the group that received supplements), but that their combination would improve the production performance of the animals. From all these examples it is clear that the number of possible combinations of different strategies for the control of gastrointestinal nematodes in sheep is large, which provides different opportunities to find the most effective, safest and most practical. However, the task is not simple and requires numerous tests, but it seems to be the only way for sustainable control of gastrointestinal nematodes in sheep in the future.

CONCLUSION

The standard application of commercial preparations in the control of gastrointestinal nematodes of sheep is becoming less and less a sustainable approach with regard to the development of resistance in nematodes, as well as due to other reasons (residues and increasing prices). That is why, recently, a lot of work is being done on defining and developing new strategies, which can be classified into two groups: the rational application of commercial preparations and the introduction of different alternative methods. Each of the strategies mentioned in this paper from any of the mentioned groups has certain advantages, as has been proven in various studies. Nevertheless, bearing in mind certain limitations of these strategies, it seems that the best effect could be achieved by their combined application. In this way, sustainable control of sheep gastrointestinal nematodes and other parasites could be achieved through integrated control in the future.

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

REFERENCES

- Abbott K. A., Taylor M., Stubbings L. A. (2017): Sustainable worm control strategies for sheep. 4th Ed. A Tehnical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers, SCOPS, 40.
- Aguerre S., Jacquet P., Brodier H., Bournazel J. P., Grisez C., Prevot F., Michot L. (2018): Resistance to gastrointestinal nematodes in dairy sheep: Genetic variability and relevance of artificial infection of nucleus rams to select for resistant ewes on farms. *Veterinary Parasitology*, 256:16-23.
- Ali R., Ahmad N., Mussarat S., Majid A., Alnomasy S. F., Khan S. N. (2021): Nanoparticles as alternatives for the control of *Haemonchus contortus*: A systematic approach to unveil new Anti-haemonchiasis agents. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 8:1-13.
- Alonso-Diaz M. A., Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro C. A., Hoste H. (2010): Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Ruminant Research*, 89(2-3):164-173.
- Andre W. P. P., Ribeiro W. L. C., Oliveira L. M. B., Macedo I. T. F., Rondon F. C. M., Bevilaqua C. M.L. (2018): Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46:1522.
- Bambou J. C., Cei W., Arquet R., Calif V., Bocage B., Mandonnet N., Alexandre G. (2021): Mixed grazing and dietary supplementation improve the response to gastrointestinal nematode parasitism and production performances of goats. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 8:628686.
- Basabe J., Eiras D. F., Romero J. R. (2009): Nutrition and gastrointestinal parasitism in ruminant production. *Archivos de Zootecnia*, 58(R):131-144.
- Bassetto C., Almeida F., Newlands G. F. J., Smith W., Castilhos A., Fernandes S., Siqueira E. (2018): Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. *Veterinary Parasitology*, 264:52-57.
- Beleckė A., Kupčinskas T., Stadalienė I., Hoglund J., Thamsborg S. M., Stuen S., Petkevičius S. (2021): Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63:18.
- Borges D. G. L., Borges F. A. (2016). Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*, 3:e92016
- Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Ianniello D., Paola Maurelli M. (2020): The threat of reduced efficacy of anthelmintics against

- gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasites & Vectors*, 13:457.
- Bresciani K. D. S., Coelho W. M. D., Gomes J. F., de Matos L. S., dos Santos T. R., Suzuki C. T. N., Lima L. G. F. (2017): Aspects of epidemiology and control of gastrointestinal nematodes in sheep and cattle - Approaches for its sustainability. *Revista de Ciencias Agrarias*, 40(3):664-669.
- Britton C., Emery D. L., McNeilly T. N., Nisbet A. J., Stear M. J. (2020): The potential for vaccines against scour worms of small ruminants. *International Journal for Parasitology*, 50(8):533-553.
- Calvete C., Gonzalez J. M., Ferrer L. M., Ramos J. J., Lacasta D., Delgado I., Uriarte J. (2020): Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 277:109018.
- Castagna F., Bava R., Musolino V., Piras C., Cardamone A., Caressi C., Lupia C. (2022): Potential new therapeutic approaches based on *Punica granatum* fruits compared to synthetic anthelmintics for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in sheep. *Animals*, 12:2883.
- Cezar A. S., Ribas H. O., Pivoto F. L., Sangioni L. A., Vogel F. S. F. (2011): Combination of drugs-parasitic as an alternative for the control of gastrointestinal nematodes multidrug resistant in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31:151-157.
- Charlier J., Rinaldi L., Musella V., Ploeger H. W., Chartier C., Vineer H., Hinney B. (2020): Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182:105103.
- Charlier J., Morgan E. R., Rinaldi L., van Dijk J., Demeler J., Höglund J., Hertzberg H., Van Ranst B., Hendrickx G., Vercruysse J., Kenyon F. (2014): Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Record*, 175(10):250-255.
- Eady S. J., Woolaston R. R., Barger I. A. (2003): Comparison of genetic and non-genetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livestock Production Science*, 81(1):11-23.
- Ehsan M., Hu R. S., Liang Q. L., Hou J. L., Song X., Yan R., Zhu X. Q. (2020): Advances in the development of anti-*haemonchus contortus* vaccines: Challenges, opportunities, and perspectives. *Vaccines*, 8(3):555.
- Falzon L. C., O'Neill T. J., Menzies P. I., Peregrine A. S., Jones-Bitton A., vanLeeuwen J., Mederos A. (2014): A systematic review and meta-analysis of
-

- factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(2):388-402.
- Ferreira L. E., Benincasa B. I., Fachin A. L., Contini S. H. T., França S. C., Chagas A. C. S., Beleboni R. O. (2018): Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: In vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 11:269.
- Fissiha W., Kinde M. Z. (2021): Anthelmintic resistance and its mechanism: A review. *Infection and Drug resistance*, 14:5403-5410.
- Giovanelli F., Mattellini M., Fichi G., Flamini G., Perrucci S. (2018): In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences*, 5(3):78.
- Goncalves T. C., Alencar M. M., Giglioti R., Bilhassi T. B., Oliveira H. N., Rabelo M. D., Esteves S. N. (2018): Resistance of sheep from different genetic groups to gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. *Small Ruminant Research*, 166:7-11.
- González J. F., Hernandez J. N., Machin C., Perez-Hernandez T., Wright H. W., Corripio-Miyar Y., Price D. R. G. (2019): Impacts of breed type and vaccination on *Teladorsagia circumcincta* infection in native sheep in Gran Canaria. *Veterinary Research*, 50(1):29.
- González-Sánchez M. E., Cuquerella M., Alunda J. M. (2018): Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS ONE*, 13(3):e0193118.
- Greer A. W., Van Wyk J. A., Hamie J. C., Byaruhanga C., Kenyon F. (2020): Refugia-Based Strategies for Parasite Control in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1):31-43.
- Hodgkinson J. E., Kaplan R. M., Kenyon F., Morgan E. R., Park A. W., Paterson S., Babayan S. A. (2019): Refugia and anthelmintic resistance: concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10:51-57.
- Hussein R. A., El-Anssary A. A. (2018): Plant secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In *Herbal Medicines*, eds by Builders P.F.
- Jamwal K., Bhattacharya S., Puri S. (2018): Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9:26-38.
- Junsoo Lee M. S., Joo H., Maskery B. A., Alpern J. D., Park C., Weinberg M., Stauffer W. M. (2021): Increases in anti-infective drug prices, subsequent prescribing, and outpatient costs. *JAMA Network Open*, 4(6):e2113963.

- Katiki L. M., Barbieri A. M. E., Araujo R. C., Verissimo C. J., Louvandini H., Ferreira J. F. S. (2017): Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243:47-51.
- Kebede A. (2019): Review on anthelmintic drug resistance nematodes and its methods of detection in Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2(1):1013.
- Kenyon F., Greer A. W., Coles G. C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret J., Berrag B. (2009): The role of target selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164(1):3-11.
- Kotze A. C., Grady J., Gough J. M., Pearson R., Bagnall N. H., Kemp D. H., Akhurst R. J. (2005): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life stages of economically important nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, 35:1013-1022.
- Kulišić Z., Aleksić N., Đorđević M., Gajić B., Tambur Z., Stevanović J., Stanimirović Z. (2013): Prevalencija i intenzitet infekcije gastrointestinalnim nematodama kod ovaca u istočnoj Srbiji. *Acta Veterinaria*, 63(4):429-436.
- Kumar N., Rao T. K. S., Varghese A., Rathor V. S. (2013): Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of Parasitic Diseases*, 37(2):151-157.
- Marjanović Đ. M., Zdravković N., Milovanović M., Trailović J. N., Robertson A. P., Todorović Z., Trailović S. M. (2020): Carvacrol acts as a potent selective antagonist of different types of nicotinic acetylcholine receptors and enhances the effect of monepantel in the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Veterinary Parasitology*, 278:109031.
- Mekonnen G. (2021): A review on gastrointestinal nematodes in ruminants. *Advances in Applied Research*, 12(7):32.
- Mesquita M. D. A., Junior J. B. E. S., Panassol A. M., de Oliveira E. F., Vasconcelos A. L. C. F., de Paula H. C. B., Bevilacqua C. M. L. (2013): Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research*, 112(9):3161-3165.
- Mphahlele M., Molefe N., Tsotetsi-Khambule A., Oriel T. (2019): Anthelmintic resistance in livestock, In *Helminthiasis*. Okwa O.O., editor, IntechOpen.
- Nisbet A. J., Meeusen E. N., González J. F., Piedrafita D. M. (2016): Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. In *Advances in Parasitology*, ed by Gasser R. B., Elsevier, XCIII:353-396.
- Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S. (2012): Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology*, 189(1):85-88.
-

- Pavlović I., Becskei Z., Ivanović S., Petrović M. P., Savić M., Petrović V. C., Bojkovski J. A. (2017): Biodiversity of helminths of sheep breed in Vojvodina (Northern Serbia). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 74:162-166.
- Potârniche A. V., Mickiewicz M., Olah D., Cerbu C., Spinu M., Hari A., Gyorke A. (2021): First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. *Animals*, 11(10):2761.
- Preston S. J. M., Sandeman M., Gonzales J., Piedrafita D. (2014): Current status of gastrointestinal nematode diagnosis of small ruminants: where are we and where we are going? *Journal of Immunology Research*, 2014:210350.
- Ramos F., Portella L. P., Rodrigues F. D. S., Reginato C. Z., Cezar A. S., Sangioni L. A., Vogel F. S. F. (2018): Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(1):48-52
- Rodrigues J. A., Roque F. L., Lima B. A., Filho G. M. S., Oliveira G. S. M., Sousa L. C., Silva A. L. P. (2022): Control of sheep gastrointestinal nematodes on pasture in the tropical semiarid region of Brazil, using Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*). *Tropical Animal Health and Production*, 54(3).
- Seyoum Z., Demessie Y., Bogale B., Melaku A. (2017): Field evaluation of the efficacy of common anthelmintics used in the control of gastrointestinal nematodes of sheep in Dabat district, Northwest Ethiopia. *Irish Veterinary Journal*, 70:18.
- Shalaby H. A. (2013): Anthelmintic resistance; How to overcome it? *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1):18-32.
- Shalaby H. A., Abu El Ezz N. M. T., Farag T. K., Abou-Zeina H. A. A. (2012): In vitro efficacy of a combination of ivermectin and *Nigella sativa* oil against helminth parasites. *Global Veterinaria*, 9:465-473.
- Soto-Barrientos N., Chan-Perez I. I., Espana-Espana E., Novelo-Chi L. K., Palma-Avila I., Ceballos-Mendoza A. C., Sarabia-Hernández J. A. (2018): Comparing body condition score and FAMACHA© to identify hair-sheep ewes with high faecal egg counts of gastrointestinal nematodes in farms under hot tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 167:92-99.
- Štrbac F., Bosco A., Maurelli M. P., Ratajac R., Stojanović D., Simin N., Orčić D. (2022b): Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal nematodes in sheep - in vitro and in vivo studies. *Veterinary Sciences*, 9(2):93.
- Štrbac F., Bosco A., Pušić I., Stojanović D., Simin N., Cringoli G., Rinaldi L. (2022a): The use of essential oils against sheep gastrointestinal nematodes. In *Animal Health Perspectives*, eds by Abbas R. Z., Khan A., Liu P., Saleemi M. K., Unique Scientific Publishers, I:86-94.
-

- Štrbac F., Krnjajić S., Maurelli M. P. M., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Ratajac R. (2022c): A potential anthelmintic phytopharmacological source of *Origanum vulgare* (L.) essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep. *Animals*, 13(1):45.
- Štrbac F., Krnjajić S., Stojanović D., Novakov N., Bosco A., Simin N., Ratajac R. (2023): Botanical control of parasites in veterinary medicine. In One Health Triad, eds by Marcelino L. A., Abbas R. Z., Khan A., Younus M., Saeed N. M., Unique Scientific Publishers, III:215-222.
- Szewc M., De Waal T., Zintl A. (2021): Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *Veterinary Journal*, 268:105602.
- Torres T. S., Sena L. S., dos Santos G. V., Filho L. A. S. F., Barbosa B. L., Junior A. D. S., Britto F. B. (2021): Genetic evaluation of sheep for resistance to gastrointestinal nematodes and body size including genomic information. *Animal Bioscience*, 34(4):516-624.
- Torres-Acosta J. F. J., Perez-Cruz M., Canul-Ku H. L., Soto-Barrientos N., Camara-Sarmiento R., Aguilar-Caballero A. J., Lozano-Argáes I. (2014): Building a combined targeted selective treatment scheme against gastrointestinal nematodes in tropical goats. *Small Ruminant Research*, 121(1):27-35.
- Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro C. A., Hoste H., Aguilar-Caballero A. J., Camara-Sarmiento R., Alonso-Díaz M. A. (2012): Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 103(1):28-40.
- Trailović S. M., Marjanović Đ. M., Trailović J. N., Robertson A. P., Martin R. J. (2015): Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology Research*, 114:3059-3068.
- Veerakumari L. (2015): Botanical anthelmintics. *Asian Journal of Science and Technology*, 6:1881-1894.
- Vilela V. L. R., Feitosa T. F., Braga F. R., Vieira V. D., de Lucena S. C., de Araujo J. V. (2018): Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 27(1).
- Vineer H. R., Eric M. R., Hertzberg H., Bartley D. J., Bosco A., Charlier J., Chartier C. (2020): Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27:69.
- Waghorn T. S., Leathwick D. M., Chen L. Y., Gray R. A. J., Skipp R. A. (2002): Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia* (Teladorsagia) *circumcincta* in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 104(2):119-129.
-

- Werne S., Isensee A., Maurer V., Perler E., Drewek A., Heckendorn F. (2013): Integrated control of gastrointestinal nematodes in lambs using a bioactive feed × breed approach. *Veterinary Parasitology*, 198(3-4):298-304.
- Worku E., Kiros A., Asgedom H., Tadesse B. (2017): Alternative control methods of gastrointestinal nematode infections in small ruminants: biological method and use of medicinal plant extracts. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3(2):11-27.
- Zvinorova P. I., Halimani T. E., Muchadeyi F. C., Matika O., Riggio V., Dzama K. (2016): Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes – the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Veterinary Parasitology*, 225:19-28.

Paper received: 12.05.2023.

Paper accepted: 10.08.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301246V

UDK 615.281:665.528.279.41

Прегледни научни рад

ЕФЕКАТ ЕТАРСКИХ УЉА НА ПАТОГЕНЕ БАКТЕРИЈЕ ПОРЕКЛОМ ИЗ МЕСА

Сузана ВИДАКОВИЋ КНЕЖЕВИЋ^{1*}, Јелена ВРАНЕШЕВИЋ¹,
Слободан КНЕЖЕВИЋ¹, Зоран РУЖИЋ², Дубравка МИЛАНОВ¹,
Сунчица КОЦИЋ-ТАНАЦКОВ³, Неђељко КАРАБАСИЋ⁴

¹Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад, Република Србија

²Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Департман за ветеринарску медицину, Нови Сад, Република Србија

³Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет, Нови Сад, Република Србија

⁴Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Република Србија

*Коресподентни аутор: Сузана Видаковић Кнежевић, suzana@niv.ns.ac.rs

Сажетак

Месо је нутритивно вредна намирница, због чега је склона микробиолошкој контаминацији и квару. Главне, храном преносиве патогене бактерије, као што су *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* и *Yersinia enterocolitica*, често се повезују са месом. Ови узрочници се налазе на врху листе пријављених зооноза код људи. Како би се повећао микробиолошки квалитет меса, последњих деценија су у употреби алтернативне супстанце, између осталог и етарска уља, једињења добијена екстракцијом из биљака, које чине “безбедну” алтернативу хемијским и синтетским адитивима, у циљу постизања антимикробних и антиоксидативних ефеката. Многа истраживања приказују антибактеријско дејство етарских уља. Ефекат деловања етарских уља на бактерије огледа се у инхибицији њиховог раста (бактериостатски ефекат) или њиховој деструкцији (бактерицидни ефекат). У овом раду приказана су комерцијално доступна етарска уља препозната као безбедна за прехранбену употребу, њихова антибактеријска дејства против храном преносивих бактерија у *in vitro* условима, механизми деловања ових етарских уља на Грам позитивне и Грам негативне бактерије, као и њихова примена на моделу меса.

Кључне речи: антибактеријска активност, екстракти биљака, механизми деловања, микробиолошки квалитет.

УВОД

Савремена индустрија меса, упркос напретку који је остварила на пољу безбедности хране и хигијене процеса производње, кроз примену добре произвођачке, добре хигијенске праксе и система безбедности хране, и даље се суочава са проблемом контроле храном преносивих патогених бактерија (Saad и сар., 2019). Узрочници водећих болести преносивих храном, као што су *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* и *Yersinia enterocolitica*, су према извештајима Европске агенције за безбедност хране и Европског центра за спречавање и контролу болести од великог здравственог и социоекономског значаја на глобалном нивоу (EFSA и ECDC, 2022). Светска здравствена организација процењује појаву преко 600 милиона случајева храном преносивих болести годишње на глобалном нивоу од којих се 420 000 заврши смртним исходом. Од тога, 40% се јавља код деце млађе од пет година (WHO, 2015).

Храном преносиве патогене бактерије, поред тога што су одговорне за велики број хоспитализованих људи широм света, утичу и на смањење рока трајања меса и производа од меса. Продужење рока трајања, између осталог, се постиже и употребом адитива. Упркос доказаним ефектима редукције микроорганизама, честа употреба адитива доводи до акумулације штетних резидуа у ланцу хране, а самим тим и до штетних ефеката на здравље људи. Забринутост потрошача о негативним ефектима хемијских адитива и соли на здравље, поред резистенције на антимикробне лекове, намеће потребу за изналагање нових препарата са антимикробним деловањем (Burt, 2004). Последњих година се за редукцију броја патогених, храном преносивих микроорганизама, као и бактерија које изазивају квар намирница, користе етарска уља као нова, алтернативна једињења. Етарска уља представљају комплексне мешавине, често на стотине индивидуалних компоненти биљака. Хемијски састав етарских уља утиче на њихов антимикробни потенцијал и варира у зависности од географског порекла биљке, састава земљишта, фазе развоја и делова биљака.

Антибактеријско дејство етарских уља заснива се на више различитих механизма деловања на ћелије бактерија (Рао и сар., 2019). Њихова потенцијална апликација у месо и производе од меса, у циљу стварања безбеднијег и дуготрајнијег производа, као и смањења инциденције нових обољења изазваних патогеним бактеријама преносивих храном, попут

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* и *Yersinia enterocolitica*, последњих деценија је предмет истраживања (Kosić-Tanackov и сар., 2017; Vidaković Knežević и сар., 2021; Šojić и сар., 2023).

Етарска уља

Етарска уља, позната још и као есенцијална или етерична уља, представљају концентроване улане течности које садрже испарљива ароматична једињења, карактеристичног мириса (Burt, 2004). Према дефиницији ISO (International Organization for Standardization) стандарда етарска уља су производи од природних сировина биљног порекла, добијени дестилацијом помоћу водене паре, механичким пресовањем епикарпа (коре) цитрусног воћа или сувом дестилацијом након одвајања водене фазе физичким процесом (ISO, 2021). Ова уља се приликом секундарног метаболизма синтетишу у свим деловима биљака (Akthar и сар., 2014), укључујући цветове, пупољке, листове, кору, семе, плодове и корење, и складиште унутар секреторних ћелија, шупљина, канала и ћелија епидерма (Burt, 2004).

Најзаступљенији начин добијања етарских уља јесте дестилација воденом паром (Rao и сар., 2019). Принос етарских уља зависи од бројних фактора. Млађе биљке дају нешто већи принос, док старије биљке производе гушћа и тамнија етарска уља. Исто важи и за култивисане биљке, у поређењу са дивљим, односно саморастућим. Метода добијања етарских уља такође утиче на њихов принос. За постизање максималног приноса битна је дужина трајања дестилације, као и температура екстракције (da Silva и сар., 2021).

Етарска уља су растворљива у липидима и органским растварачима (Akthar и сар., 2014), док су у води слабо растворљива (Rios, 2016). На собној температури су углавном течне конзистенције. Хемијски састав и квалитет етарских уља исте биљне врсте зависе од генотипа, области где се биљка гаји, климатских услова, вегетативне фазе и делова биљака који се користе за добијање етарских уља, услова складиштења, као и методе добијања етарских уља (Rios, 2016). Израз хемотип користи се у описивању етарских уља исте биљне врсте која варирају у хемијском саставу. Обично су етарска уља смеше различитог броја компоненти (Rao и сар., 2019) од којих се неке налазе у траговима, док су друге заступљене у преко 85% укупног састава (Табела 1) (Burt, 2004; Vidaković Knežević и сар., 2023). Ове компоненте се сврставају у групе једињења, као што су терпени, терпеноиди, ароматична и алифатична једињења мале молекулске масе која одређују биолошка својства етарских уља (Bakkali и сар., 2008; Rao и сар., 2019).

Табела 1 Главне компоненте одабраних етарских уља и њихова заступљеност
 (Vidaković Knežević и сар., 2023)

Редни број	Етарско уље	Латински назив	Назив компоненте	Садржај компоненте (%)
1.	Босиљак	<i>Ocimum basilicum</i>	Естрагол	69,52
2.	Црни бибер	<i>Piper nigrum</i>	β-Пинен	19,31
3.	Тајландски ђумбир	<i>Zingiber cassumunar</i>	Сабинен	39,17
4.	Цимет	<i>Cinnamomum zeylanicum nees</i>	Цинамалдехид	74,93
5.	Каранфилић	<i>Syzygium aromaticum L.</i>	Еугенол	85,14
6.	Смиље	<i>Helichrysum italicum</i>	Кариофилен	21,48
7.	Фенел	<i>Foeniculum vulgare</i>	Анетол	88,42
8.	Анђелика	<i>Angelica archangelica</i>	β-Феландрен	41,57
9.	Милодух	<i>Hyssopus officinalis</i>	Цис-Пинокамфон	27,42
10.	Лаванда	<i>Lavandula angustifolia</i>	Линалил ацетат	25,33
11.	Лимун	<i>Citrus limonum</i>	Лимонен	79,72
12.	Мирта	<i>Myrtus communis</i>	α-Пинен	35,47
13.	Оригано	<i>Origanum vulgare</i>	Карвакрол	81,00
14.	Рузмарин	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α-Пинен	28,23
15.	Жалфија	<i>Salvia officinalis</i>	Линалил ацетат	56,41
16.	Тимијан	<i>Thymus vulgaris</i>	p-Цимен	40,91
17.	Вресак	<i>Satureja montana</i>	Карвакрол	50,45
18.	Хајдучка трава	<i>Achillea millefolium</i>	Сабинен	22,70

Данас је познато преко 3.000 етарских уља, док је око 300 од комерцијалног значаја (Bakkali и сар., 2008). Водеће земље у производњи етарских уља су Кина и Индија, праћене Индонезијом, Шри Ланком и Вијетнамом. У Европи највећу количину етарских уља произведу Француска и Немачка, након којих следе Шпанија, Грчка и Велика Британија. Највеће количине етарских уља употребе се у прехранбеној и индустрији пића (35%), козметици и

ароматерапији (29%), производима за домаћинство (16%) и фармацеутској индустрији (15%) (Barbieri и Borsotto, 2018). Широка употреба етарских уља у различитим доменима указала је на потребу постављања критеријума квалитета. Поред ISO стандарда (ISO, 2021) многа удружења и компаније, попут Association Française for Normalization, Generally Recognized As Safe (GRAS), Fragrance Materials Association, the International Fragrance Association, Bundesinstitut für Risikobewertung, Research Institute for Fragrance Materials и Scientific Committee on Consumer Safety, поставили су своје критеријуме састава и квалитета (Rios, 2016).

Предуслов за употребу етарских уља у прехранбеној индустрији, према GRAS, јесте хемијска идентификација и чистоћа супстанце, као и утврђивање присуства секундарних компоненти. Стога су развијене и поуздане методе за анализу етарских уља. Примена техника гасне хроматографије (GC) и гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC-MS) су најчешће у анализи етарских уља данас. Ове методе омогућавају утврђивање хемијског састава етарских уља и концентрације њихових једињења. Различите шарже комерцијалних етарских уља могу да се разликују по хемијском саставу. Стога је, према GRAS, неопходно дефинисати максимално дозвољену концентрацију одређених једињења (Smith и сар., 2005). У прехранбеној индустрији је дозвољена употреба великог броја етарских уља, између осталог и етарских уља анђелике (*Angelica archangelica*), аниса (*Pimpinella anisum* L.), босиљка (*Ocimum basilicum* L.), цимета (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), коријандера (*Coriandrum sativum* L.), фенела (*Foeniculum vulgare* Mill.), ђумбира (*Zingiber officinale* Rosc.), лаванде (*Lavandula officinalis* Chaix.), лимуна (*Citrus limon*), црног биберa (*Piper nigrum* L.), рузмарина (*Rosmarinus officinalis* L.), оригана (*Origanum vulgare*), жалфије (*Salvia officinalis* L.) и тимијана (*Thymus vulgaris*) (FDA, 2021).

Антибактеријска активност етарских уља

Дејство етарских уља на бактерије огледа се у инхибицији њиховог раста (бактериостатско деловање) или уништењу бактеријске ћелије (бактерицидно деловање) (Swamy и сар., 2016). Антибактеријска активност се, на основу наведених дејстава, мери минималном инхибиторном концентрацијом (MIC) или минималном бактерицидном концентрацијом (MBC) (Burt, 2004).

За процену антибактеријске активности етарских уља не постоји стандардна метода. У ову сврху прилагођени су водичи NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

и EUCAST (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), примарно развијени за процену активности антибиотика (Rao и сар., 2019). Различити типови *in vitro* тестова се примењују у циљу утврђивања антибактеријске активности етарских уља, а њихов избор зависи од неколико карактеристика, од којих су захтевност технике и цена извођења најзаступљеније. Брзо утврђивање антибактеријске активности етарских уља се обично врши агар дифузионом или диск-дифузионом методом, када се етарска уља додају у бунарчиће направљене у агару или на дискове филтер папира који се налазе на површини агара који садржи инокулисани циљани бактеријски изолат. Након инкубације појављује се зона инхибиције раста микроорганизама, која представља антибактеријску активност (Swamy и сар., 2016). Јачина антибактеријске активности најчешће се утврђује разблаживањем етарских уља у бујону применом микродилуционе методе. Овај начин испитивања антибактеријске активности етарских уља је осетљивији, а утврђивање МИС се заснива на мерењу оптичке густине, бројању преживелих колонија бактерија или употреби ресазурина као индикатора (Burt, 2004). Поред нестандардизованости метода, потешкоће у одређивању антибактеријских активности етарских уља последица су њихове нерастворљивости у води и испарљивости. Од посебне важности јесте хидрофобност и висок вискозитет етарских уља, који узрокују неправилну дистрибуцију кроз медијум приликом примене дифузионе методе, као и неједнаку растворљивост код дилуционих метода. Ово се може избећи употребом растварача попут етанола, метанола, Tween-20, Tween-80, ацетона, диметил сулфоксида (DMSO), n-хексана и пропилен глицерола. Резултати испитивања осетљивости микроорганизама на етарска уља зависе од примењене методе, врсте и количине хранљивог медијума, концентрације инокулума, температуре и времена инкубације, као и порекла коришћених етарских уља (Burt, 2004).

Механизми деловања етарских уља на бактерије

Упркос многобројним испитивањима антибактеријског деловања етарских уља њихови механизми још нису у потпуности објашњени. Генерално, ови механизми се могу приписати физичким, хемијским или биохемијским променама бактерија изложених етарским уљима. Различите компоненте могу да делују различитим механизмима и могу за циљ имати различите врсте бактерија. Грам негативне бактерије су се показале као мање осетљиве на етарска уља у односу на Грам позитивне бактерије (Burt, 2004), што је резултат разлика у њиховој грађи. Грађа ћелијског зида Грам негативних

бактерија је комплекснија. Танак слој пептидогликана обавијен је спољашњом мембраном. Ове две структуре чврсто су повезане Брауновим липопротеинима. Спољашња мембрана Грам негативних бактерија грађена је од липидног двослоја повезаног полисахаридима са унутрашњом мембраном. Спољашња мембрана ствара баријеру и штити ћелију од етарских уља (Burt, 2004; Böhme и сар., 2013). Ипак, мали хидрофилни раствори могу да прођу кроз спољашњу мембрану преко порин протеина који служе као хидрофилни трансмембрански канали.

С друге стране, структура ћелијског зида Грам позитивних бактерија дозвољава лаку пенетрацију хидрофобних молекула. Овакви молекули, попут етарских уља, делују на ћелијски зид и унутар цитоплазме (Nazzaro и сар., 2013). Оно што је заједничко, без обзира на грађу, јесте да етарска уља, као типични липофили, пролазе кроз ћелијски зид и цитоплазматску мембрану, реметећи структуру полисахарида, масних киселина и фосфолипида. Оштећење цитоплазматске мембране узрокује њену пропустљивост и цурење ћелијског садржаја, губитак јона, колапс протонске пумпе, трошење аденозин трифосфата (АТР) и ћелијску лизу (Burt, 2004; Böhme и сар., 2013; Rao и сар., 2019).

Главне компоненте неких етарских уља, карвакрол и *p*-цимен, индукују синтезу протеина топлотног стреса који су укључени у различите процесе синтезе и ослобађања полипептида. Код ћелија *Escherichia coli* O157:H7 третиране карвакролом долази до значајног повећања количине протеина топлотног стреса (GroEL) и до инхибиције синтезе флагелина што резултира непокретљивошћу ћелија. Ћелије салмонела третиране сублеталним концентрацијама тимола синтетишу сет протеина шаперона (DnaK, GroEL, HTrpG), протеине спољашње мембране (OmpX, OmpA) и протеине који су директно или индиректно укључени у метаболизам цитрата и синтезу АТР. Ова различита деловања категоришу тимол као великог стресора за ћелије салмонела (Di Pasqua и сар., 2010). Истраживања показују и смањење рН вредности бактеријских ћелија изложених деловању етарских уља. Третирањем ћелија *Salmonella* Typhi MIC етарског уља слачице рН вредност се са 6,59 смањује на 5,44, а код *Escherichia coli* O157:H7 са 6,23 на 5,20 (Turgis и сар., 2009). Узимајући у обзир велики број различитих група хемијских једињења која чине етарско уље, највероватније је да њихово антибактеријско дејство не може да се припише једном механизму, него да постоји неколико мета у ћелији. Такође, упркос великом броју хемијских компоненти које чине етарско уље, антибактеријска дејства се обично приписују најзаступљенијој компоненти, или пак синергистичном деловању више компоненти (Burt, 2004).

Примена етарских уља на моделу меса

Месо је нутритивно вредна намирница у исхрани људи. Ипак, патогене бактерије преносиве храном могу, својим присуством у месу, предствљају хазард за потрошаче уколико месо није довољно термички обрађено, односно уколико дође до његове унакрсне контаминације. Месо може бити извор инфекција људи бактеријама као што су *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. и *Yersinia enterocolitica* (Vidaković и сар., 2020; Velhner и сар., 2020; Ljubojević Pelić и сар., 2021).

Применом етарских уља органа и тимијана у уситњеном месу са мање масти ($\leq 7\%$) на популацију *Listeria monocytogenes* постигнута је значајна редукција истих сладиштењем на 4°C током 4 дана. Прва редукција броја *Listeria monocytogenes* запажена је другог дана у узорцима третираних етарским уљем органа у количини од $0,36 \mu\text{L/g}$, и етарским уљем тимијана у количини од $0,36 \mu\text{L/g}$ и $0,72 \mu\text{L/g}$. Етарска уља органа и тимијана у количини од $0,36 \mu\text{L/g}$ редуковали су број *Listeria monocytogenes* готово идентично, односно за $0,26 \log_{10} \text{CFU/g}$ и $0,27 \log_{10} \text{CFU/g}$, док је етарско уље тимијана у количини од $0,72 \mu\text{L/g}$ редуковало број *Listeria monocytogenes* за $0,42 \log_{10} \text{CFU/g}$. На крају складиштења, односно 4. дана, редукција броја *Listeria monocytogenes* кретала се између $0,25 \log_{10} \text{CFU/g}$ и $0,51 \log_{10} \text{CFU/g}$ приликом примене етарског уља органа, односно између $0,22 \log_{10} \text{CFU/g}$ и $0,29 \log_{10} \text{CFU/g}$ приликом примене етарског уља тимијана. Примењене концентрације етарских уља одговарале су МІС и 2МІС вредностима добијеним применом бујон микродилуционе методе (Vidaković Knežević и сар., 2023).

Етарско уље першуна нането на моделу пршуте своју антимикробну активност показало је при концентрацији од 6% , док је у *in vitro* тесту МІС износила $0,018\%$ (Gill и сар., 2002). С друге стране, висока концентрација етарских уља на/у месу и производима од меса може да утиче на њихова органолептичка својства. Етарска уља поседују интензивну арому чак и у веома ниским концентрацијама (Chivandi и сар., 2016). Смањење органолептичког ефекта додатих етарских уља у матрикс меса или производа од меса може се постићи инкапсулацијом етарских уља у наноемулзију. Овај начин повећава стабилност испарљивих компоненти, штитећи их од интеракције са матриксом меса уз повећање антимикробне активности кроз повећање пасивног ћелијског усвајања (Donsì и сар., 2011; Pan и сар., 2014). Смањење концентрације етарских уља, без нарушавања његове антимикробне активности, у моделима хране, може се постићи комбинацијом два или више етарска уља или њихових једињења. На овај начин се постиже синергистично деловање (Gutierrez и сар.,

2008). Запажено је синергистично деловање етарских уља дрвета мастике (*Pistacia lentiscus*) и вреска (*Satureja montana*) у моделу уситњеног говеђег меса против *Listeria monocytogenes* (Djenane и сар., 2011), као и етарских уља босиљка и рузмарина у пилећем месу против *Salmonella Enteritidis* (Stojanović-Radić и сар., 2018).

Примена етарских уља, као конзерванаса меса и производа од меса, захтева добро познавање њихових особина, начина деловања, антимикробни потенцијал и интеракцију са компонентама матрикса. Садржај масти, протеина, активност воде, рН и ензими могу да смање потенцијални ефекат етарских уља у матриксу меса и производа од меса. Високе концентрације масти, протеина и угљених хидрата могу да заштите бактерије стварајући заштитни омотач и апсорбујући етарска уља (Burt, 2004; Böhme и сар., 2013).

ЗАКЉУЧАК

Примена етарских уља у борби против патогених бактерија пореклом из меса показала се као успешна у лабораторијским условима. Етарска уља делују различитим механизмима против Грам позитивних и Грам негативних бактерија у веома малим концентрацијама. Ипак, примена етарских уља у моделима меса, односно хране, захтева додатна истраживања. Компоненте хране често штите бактеријске ћелије и омогућавају им брже опорављање, због чега су потребне веће количине етарских уља у моделима меса. С друге стране, као ароматичне смеше, етарска уља нарушавају органолептичка својства меса, односно хране. Истраживања су данас усмерена на изналажењу различитих стратегију у циљу омогућавања употребе етарских уља у производњи хране, као алтернатива за различите адитиве и хемијске супстанце.

Захвалница

Овај рад је резултат истраживања по Уговору са Министарством науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИВ-НС у 2023. години, број 451-03-47/2023-01/200031.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Akthar M. S., Degaga B., Azam T. (2014): Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1):001-007.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2):446-475.
- Barbieri C., Borsotto P. (2018): Essential oils: market and legislation. In Potential of Essential Oils. Eds. H. A. El-Shemy, IntechOpen, 107-127.
- Böhme K., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P., Aubourg S. P. (2013): Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives. Eds. T. G. Villa, P. Veiga-Crespo, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 51-81.
- Burt S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3):223-253.
- Chivandi E., Dangarembizi R., Nyakudya T. T., Erlwanger K. H. (2016): Use of essential oils as a preservative of meat. In Essential oils in food preservation, flavor and safety. Ed. V. R. Preedy, Academic Press, 85-91.
- da Silva B. D., Bernardes P. C., Pinheiro P. F., Fantuzzi E., Roberto C. D. (2021): Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.
- Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. (2010): Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10(5):1040-1049.
- Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P. (2011): Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food control*, 22(7):1046-1053.
- Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. (2011): Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9):1908-1914.
- EFSA i ECDC. (2022): The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12):e07666.
- FDA. (2021): Substances generally recognized as safe. Essential oils, oleoresins (solvent free), and natural extractives (including distillates). *Code of Federal Regulations*, 3:21CFR182.20.
-

- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. (2002): Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International journal of food microbiology*, 73(1):83-92.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008): The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124(1):91-97.
- ISO. (2021): Aromatic natural raw materials – Vocabulary. International Organization for Standardization, ISO 9235.
- Kocić-Tanackov S., Blagojev N., Suturović I., Dimić G., Pejin J., Tomović V., Šojić B., Savanović J., Kravić S., Karabasil N. (2017): Antibacterial activity of essential oils against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 68(4):88-95.
- Ljubojević Pelić D., Vidaković Knežević S., Pelić M., Živkov Baloš M., Milanov D. (2021): The epidemiological significance of duck meat as a source of *Salmonella* spp. a review. *World's Poultry Science Journal*, 77(1):105-114.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013): Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12):1451-1474.
- Pan K., Chen H., Davidson P. M., Zhong Q. (2014): Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(7):1649-1657.
- Rao J., Chen B., McClements D. J. (2019): Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, 10:365-387.
- Rios J. L. (2016): Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Ed. V. R. Preedy, Academic Press, 3-10.
- Saad S. M., Shaltout F. A., Abou Elroos N. A., El-nahas S. B. (2019): Antimicrobial effect of some essential oils on some pathogenic bacteria in minced meat. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 2(1):13-21.
- Smith R. L., Cohen S. M., Doull J., Feron V. J., Goodman J. I., Marnett L. J., Portoghesi P. S., Waddell W. J., Wagner B. M., Hall R. L., Higley N. A., Lucas-Gavin C., Adams T. B. (2005): A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and chemical toxicology*, 43(3):345-363.
- Šojić B., Ikonić P., Kocić-Tanackov S., Peulić T., Teslić N., Županjac M., Lončarević I., Zeković Z., Popović M., Vidaković S., Pavlić B. (2023). Antibacterial Activity of Selected Essential Oils against Foodborne Pathogens and Their Application in Fresh Turkey Sausages. *Antibiotics*, 12(1):182.
-

- Stojanović-Radić Z., Pejčić M., Joković N., Jokanović M., Ivić M., Šojić B., Škaljac S., Stojanović P., Mihajilov-Krstev T. (2018). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. *Food Control*, 90:332-343.
- Swamy M. K., Akhtar M. S., Sinniah U. R. (2016): Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 3012462:1-21.
- Turgis M., Han J., Caillet S., Lacroix M. (2009): Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food control*, 20(12):1073-1079.
- Velhner M., Velebit B., Todorović D., Pelić M., Vidaković Knežević S., Prunić B., Milanov D. (2020): A brief overview of emergencies and dissemination of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in humans and food producing animals. *Archives of Veterinary Medicine*, 13(2):5-15.
- Vidaković Knežević S., Knežević S., Vranešević J., Kravić S. Ž., Lakićević B., Kocić-Tanackov S., Karabasil N. (2023). Effects of Selected Essential Oils on *Listeria monocytogenes* in Biofilms and in a Model Food System. *Foods*, 12(10):1930.
- Vidaković Knežević S., Kocić-Tanackov S., Kravić S., Knežević S., Vranešević J., Savić Radovanović R., Karabasil N. (2021): In vitro antibacterial activity of some essential oils against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from meat. *Journal of Food Safety and Food Quality*, 72(1):4-11.
- Vidaković S., Vranešević J., Knežević S., Pelić M., Ružić Z., Pajić M., Ljubojević Pelić D. (2020): Microbiological property of raw meat imports in the year 2017. *Veterinary journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, 20(1-2):118-124.
- WHO. (2015): WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization.

Рад примљен: 05.07.2023.
Рад прихваћен: 27.09.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301258V

UDK 615.281:665.528.279.41

Review scientific paper

THE EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON PATHOGENIC BACTERIA IN MEAT

Suzana VIDAKOVIĆ KNEŽEVIĆ^{1*}, Jelena VRANEŠEVIĆ¹, Slobodan KNEŽEVIĆ¹, Zoran RUŽIĆ², Dubravka MILANOV¹, Sunčica KOCIĆ-TANACKOV³, Nedeljko KARABASIL⁴

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Republic of Serbia

²University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad, Republic of Serbia

³University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Republic of Serbia

⁴University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Republic of Serbia

*Corresponding author: Suzana Vidaković Knežević, suzana@niv.ns.ac.rs

Summary

Meat is a nutritionally valuable food which is susceptible to microbiological contamination and spoilage. Major foodborne pathogenic bacteria, such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*, are often associated with meat. These causative factors are at the top of the list of reported zoonoses in humans. In order to increase the microbiological quality of meat, alternative substances have been used in recent decades, including essential oils, compounds obtained by extraction from plants, which are a “safe” alternative to chemical and synthetic additives, in order to achieve antimicrobial and antioxidant effects. Many studies show the antibacterial effect of essential oils. The effect of essential oils on bacteria includes the inhibition of growth (bacteriostatic effect) or destruction of bacteria (bactericidal effect). This paper presents commercially available essential oils recognized as safe for use in food industry, their antibacterial effects against food-borne bacteria *in vitro*, the mechanisms of action of these essential oils on Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as their application on a meat model.

Key words: antibacterial activity, plant extracts, mechanisms of action, microbiological quality.

INTRODUCTION

Despite the progress in the field of food safety and the production process hygiene, through the application of good production and good hygiene practices as well as food safety systems, the modern meat industry still faces the problem of controlling food-borne pathogenic bacteria (Saad et al., 2019). The causative factors of the leading foodborne diseases, such as *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*, are, according to the reports of the European Food Safety Agency and the European Center for Disease Prevention and Control, of great health and socioeconomic importance at the global level (EFSA and ECDC, 2022). The World Health Organization reported over 600 million cases of food-borne diseases annually globally, of which 420 000 are deadly. Of these, 40% occur in children under the age of five (WHO, 2015).

Food-borne pathogenic bacteria, in addition to being responsible for a hospitalizing people worldwide, also affect the reduction of the shelf life of meat and meat products. Extending the shelf life, among others, is achieved through the use of additives. Despite the proven effects of reducing microorganisms, the frequent use of additives leads to the accumulation of harmful residues in the food chain, and thus to harmful effects on human health. Consumer concern about the negative effects of chemical additives and salt on health, in addition to resistance to antimicrobial drugs, imposes the need to find new antimicrobial substances (Burt, 2004). In recent years, essential oils have been used as new, alternative compounds to reduce the number of pathogenic, food-borne microorganisms, as well as bacteria that cause food spoilage. Essential oils are complex mixtures, often composed of hundreds of individual plant components. The chemical composition of essential oils affects their antimicrobial potential and varies depending on the geographical origin of the plant, soil composition, stage of development and plant parts.

The antibacterial effect of essential oils is based on several different mechanisms of action on bacterial cells (Rao et al., 2019). Their potential usage in meat and meat products, with the aim of creating a safer and longer-lasting product, as well as their role in reducing the incidence of new diseases caused by food-borne pathogenic bacteria, such as *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica*, has been the subject of studies in recent decades (Kocić-Tanackov et al., 2017; Vidaković Knežević et al., 2021; Šojić et al., 2023).

ESSENTIAL OILS

Etheric oils, also known as essential oils, are concentrated oily liquids that contain volatile aromatic compounds with a characteristic smell (Burt, 2004). According to the definition of the ISO (International Organization for Standardization), essential oils are products from natural raw materials of plant origin, obtained by steam distillation, by mechanical processes from the epicarp of citrus fruits or by dry distillation after separation of the aqueous phase by a physical processes (ISO, 2021). These oils are synthesized during secondary metabolism in all parts of plants (Akthar et al., 2014), including flowers, buds, leaves, bark, seeds, fruits, and roots, and stored within secretory cells, cavities, ducts, and epidermal cells (Burt, 2004). The most common method of obtaining essential oils is steam distillation (Rao et al., 2019). The yield of essential oils depends on a number of factors. Younger plants give a slightly higher yield, while older plants produce thicker and darker essential oils. The same applies to cultivated plants, compared to wild, i.e. self-growing. The method of obtaining essential oils also affects their yield. To achieve the maximum yield, the length of time of distillation is important, as is the temperature of extraction (da Silva et al., 2021).

Essential oils are soluble in lipids and organic solvents (Akthar et al., 2014), while they are poorly soluble in water (Rios, 2016). At room temperature, they are mostly liquid. The chemical composition and quality of essential oils of the same plant species depend on the genotype, the area where the plant grow, climatic conditions, the vegetative phase and plant parts used to obtain essential oils, storage conditions, and the method of obtaining essential oils (Rios, 2016). The term chemotype is used to describe essential oils of the same plant species that vary in chemical composition. Usually, essential oils are mixtures of a different components (Rao et al., 2019), some of which are found in traces, while others are present in over 85% of the total composition (Table 1) (Burt, 2004; Vidaković Knežević et al., 2023). These components are classified into groups, such as terpenes, terpenoids, low molecular weight aromatic and aliphatic compounds that determine the biological properties of essential oils (Bakkali et al., 2008; Rao et al., 2019).

Table 1 Main components of selected essential oils and their presence (Vidaković Knežević et al., 2023)

Number	Essential oil	Latin name	Component name	Presence of component (%)
1.	Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	Estragol	69.52
2.	Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	β -Pinene	19.31
3.	Thai ginger	<i>Zingiber cassumunar</i>	Sabinene	39.17
4.	Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum nees</i>	Cinnamaldehyde	74.93
5.	Clove	<i>Syzygium aromaticum L.</i>	Eugenol	85.14
6.	Everlasting flower	<i>Helichrysum italicum</i>	Caryophyllene	21.48
7.	Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	Anethole	88.42
8.	Angelica	<i>Angelica archangelica</i>	β -Phelandrene	41.57
9.	Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	Cis-Pinocamphone	27.42
10.	Lavender	<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalyl acetate	25.33
11.	Lemon	<i>Citrus limonum</i>	Limonene	79.72
12.	Myrtle	<i>Myrtus communis</i>	α -Pinene	35.47
13.	Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	81.00
14.	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pinene	28.23
15.	Sage	<i>Salvia officinalis</i>	Linalyl acetate	56.41
16.	Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	p-Cymen	40.91
17.	Heather	<i>Satureja montana</i>	Carvacrol	50.45
18.	Yarrow	<i>Achillea millefolium</i>	Sabinene	22.70

Nowadays, over 3 000 essential oils are known and about 300 are commercially important (Bakkali et al., 2008). The leading countries in the production of essential oils are China and India, followed by Indonesia, Sri Lanka and Vietnam. In Europe, France and Germany produce the largest quantities of essential oils, followed by Spain, Greece and Great Britain. The largest quantities of essential oils are used in the food and beverage industry (35%), cosmetics and aromatherapy (29%), household products (16%) and the pharmaceutical industry (15%) (Barbieri and

Borsotto, 2018). The wide use of essential oils in various domains indicated that quality criteria should be set. In addition to the ISO standard (ISO, 2021), many associations and companies, such as the Association Française for Normalization, Generally Recognized As Safe (GRAS), Fragrance Materials Association, the International Fragrance Association, Bundesinstitut für Risikobewertung, Research Institute for Fragrance Materials and the Scientific Committee on Consumer Safety, have set composition and quality criteria (Rios, 2016).

The prerequisite for the use of essential oils in the food industry, according to GRAS, is the chemical identification and purity of the substance, as well as the determination of the presence of secondary components. Therefore, reliable methods for the analysis of essential oils have been developed. The application of gas chromatography (GC) and gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) techniques are most common in the analysis of essential oils today. These methods make it possible to determine the chemical composition of essential oils and the concentration of their compounds. Different batches of commercial essential oils can vary in chemical composition. Therefore, according to GRAS, it is necessary to define the maximum allowed concentration of certain compounds (Smith et al., 2005). In the food industry, the use of a large number of essential oils is permitted, including the essential oils of angelica (*Angelica archangelica*), anise (*Pimpinella anisum* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Nees), coriander (*Coriandrum sativum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), lavender (*Lavandula officinalis* Chaix.), lemon (*Citrus limon*), black pepper (*Piper nigrum* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris*) (FDA, 2021).

Antibacterial effects of essential oils

The effect of essential oils on bacteria is reflected in the inhibition of their growth (bacteriostatic action) or the destruction of the bacterial cell (bactericidal action) (Swamy et al., 2016). Antibacterial activity, based on the mentioned effects, is measured by minimum inhibitory concentration (MIC) or minimum bactericidal concentration (MBC) (Burt, 2004).

There is no standard method for evaluating the antibacterial activity of essential oils. For this purpose, the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) and EUCAST (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) guidelines were primarily developed for the assessment of antibiotic activity (Rao et al., 2019).

Different types of *in vitro* tests are applied in order to determine the antibacterial activity of essential oils, and their selection depends on several characteristics, of which the complexity of the technique and the cost are the most relevant. Rapid determination of the antibacterial activity of essential oils is usually performed by the agar diffusion or disk diffusion method, when essential oils are added to wells made in agar or to filter paper discs placed on the surface of the agar containing the inoculated target bacterial isolate. After incubation, a zone of microorganism growth inhibition appears, which represents antibacterial activity (Swamy et al., 2016). The intensity of antibacterial activity is most often determined by diluting essential oils in broth using the microdilution method. This pattern of testing the antibacterial activity of essential oils is more sensitive, and the determination of MIC is based on measuring optical density, counting surviving bacterial colonies or using resazurin as an indicator (Burt, 2004).

In addition to non-standardization of methods, difficulties in determining the antibacterial activity of essential oils are their insolubility in water and volatility. Of particular importance is the hydrophobicity and high viscosity of essential oils, which cause irregular distribution through the medium when applying the diffusion method, as well as unequal solubility in dilution methods. This can be avoided by using solvents such as ethanol, methanol, Tween-20, Tween-80, acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO), n-hexane, and propylene glycerol. The results of testing the sensitivity of microorganisms to essential oils depend on the applied method, type and amount of nutrient medium, inoculum concentration, temperature and incubation time, as well as the origin of the essential oils used (Burt, 2004).

Mechanisms of action of essential oils on bacteria

Despite numerous tests on the antibacterial effect of essential oils, their mechanisms have not yet been fully explained. In general, these mechanisms can be attributed to physical, chemical or biochemical changes in bacteria exposed to essential oils. Different components may act by different mechanisms and may target different types of bacteria. Gram-negative bacteria have been shown to be less sensitive to essential oils than Gram-positive bacteria (Burt, 2004), which is a result of differences in their structure. The structure of the cell wall of Gram-negative bacteria is more complex. A thin layer of peptidoglycan is surrounded by the outer membrane. These two structures are tightly linked by Brown's lipoproteins. The outer membrane of Gram-negative bacteria is made of a lipid bilayer connected by polysaccharides to the inner membrane. The outer membrane creates a barrier and protects the cell from essential oils (Burt, 2004; Böhme et al., 2013). However,

small hydrophilic solutes can pass through the outer membrane via porin proteins that serve as hydrophilic transmembrane channels.

On the other hand, the cell wall structure of Gram-positive bacteria allows easy penetration of hydrophobic molecules. Such molecules, like essential oils, act on the cell wall and the cytoplasm (Nazzaro et al., 2013). Common factor, regardless of their composition, is that essential oils, as typical lipophiles, pass through the cell wall and cytoplasmic membrane, disrupting the structure of polysaccharides, fatty acids and phospholipids. Damage to the cytoplasmic membrane causes its permeability and leakage of cell contents, ion loss, proton pump collapse, adenosine triphosphate (ATP) depletion, and cell lysis (Burt, 2004; Böhme et al., 2013; Rao et al., 2019).

The main components of some essential oils, carvacrol and p-cymene, induce the synthesis of heat stress proteins involved in various processes of polypeptide synthesis and release. In *Escherichia coli* O157:H7 cells treated with carvacrol, there is a significant increase in the amount of heat stress protein (GroEL) and inhibition of flagellin synthesis, resulting in cell immobility. Salmonella cells treated with sublethal concentrations of thymol synthesize a set of chaperone proteins (DnaK, GroEL, HtpG), outer membrane proteins (OmpX, OmpA) and proteins that are directly or indirectly involved in citrate metabolism and ATP synthesis. These different actions categorize thymol as a major stressor for Salmonella cells (Di Pasqua et al., 2010). Studies also show a decrease in the pH value of bacterial cells exposed to the essential oils. By treating the cells of *Salmonella* Typhi, the MIC of the essential oil of licorice reduces the pH value from 6.59 to 5.44, and in *Escherichia coli* O157:H7 from 6.23 to 5.20 (Turgis et al., 2009). Considering the large number of different groups of chemical compounds within the essential oil, it is most likely that their antibacterial effect cannot be attributed to a single mechanism, but that there are several targets in the cell. Also, despite the large number of chemical components within the essential oil, the antibacterial effects are usually attributed to the most abundant component, or to the synergistic action of several components (Burt, 2004).

Application of essential oils on the meat model

Meat is a nutritionally valuable food in the human diet. However, pathogenic bacteria transmitted through food can be, due to their presence in meat, a hazard for consumers if the meat is not sufficiently thermally processed, that is, if its cross-contamination occurs. Meat can be a source of human infections with bacteria such as *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp.

and *Yersinia enterocolitica* (Vidaković et al., 2020; Velhner et al., 2020; Ljubojević Pelić et al., 2021).

By applying essential oils of oregano and thyme in minced meat with less fat ($\leq 7\%$) to the population of *Listeria monocytogenes*, a significant reduction was achieved during storage at 4°C for 4 days. The first reduction in the number of *Listeria monocytogenes* was observed on the second day in samples treated with essential oil of oregano in the amount of 0.36 $\mu\text{L/g}$, and essential oil of thyme in the amounts of 0.36 $\mu\text{L/g}$ and 0.72 $\mu\text{L/g}$. Oregano and thyme essential oils in an amount of 0.36 $\mu\text{L/g}$ reduced the number of *Listeria monocytogenes* almost identically, i.e. by 0.26 $\log_{10}$ CFU/g and 0.27 $\log_{10}$ CFU/g, while thyme essential oil in an amount of 0.72 $\mu\text{L/g}$ reduced the number of *Listeria monocytogenes* by 0.42 $\log_{10}$ CFU/g. At the end of storage, i.e. on the 4th day, the reduction in the number of *Listeria monocytogenes* ranged between 0.25 $\log_{10}$ CFU/g and 0.51 $\log_{10}$ CFU/g when applying essential oil of oregano, i.e. between 0.22 $\log_{10}$ CFU/g and 0.29 $\log_{10}$ CFU/g when applying thyme essential oil. The applied concentrations of essential oils corresponded to the MIC and 2MIC values obtained using the broth microdilution method (Vidaković Knežević et al., 2023).

Parsley essential oil applied to a prosciutto model showed its antimicrobial activity at a concentration of 6%, while in an *in vitro* test the MIC was 0.018% (Gill et al., 2002). On the other hand, a high concentration of essential oils on/in meat and meat products can affect their organoleptic properties. Essential oils have an intense aroma even at very low concentrations (Chivandi et al., 2016). Reducing the organoleptic effect of added essential oils in the matrix of meat or meat products can be achieved by encapsulating essential oils in a nanoemulsion. This increases the stability of volatile components, protecting them from interaction with the meat matrix while increasing antimicrobial activity through increasing passive cellular uptake (Donsì et al., 2011; Pan et al., 2014). Reducing the concentration of essential oils, without impairing its antimicrobial activity, in food models, can be achieved by combining two or more essential oils or their compounds. Thus, synergistic action is achieved (Gutierrez et al., 2008). The synergistic effect of essential oils of mastic tree (*Pistacia lentiscus*) and heather (*Satureja montana*) was observed in the model of minced beef against *Listeria monocytogenes* (Djenane et al., 2011), as well as essential oils of basil and rosemary in chicken meat against *Salmonella* Enteritidis (Stojanović -Radić et al., 2018).

The application of essential oils, as preservatives in meat and meat products, requires a good knowledge of their properties, mode of action, antimicrobial potential and interaction with matrix components. Fat content, protein content, water activity, pH and enzymes can reduce the potential effect of essential oils in the matrix of meat and meat products. High concentrations of fats, proteins and carbohydrates

can protect bacteria by creating a protective coat and absorbing essential oils (Burt, 2004; Böhme et al., 2013).

CONCLUSION

The application of essential oils against pathogenic bacteria in meat has proven to be successful in laboratory conditions. Essential oils act by different mechanisms against Gram-positive and Gram-negative bacteria in very low concentrations. However, the application of essential oils in meat models, i.e. food, requires additional research. Food components often protect bacterial cells and allow them to recover faster, which is why larger amounts of essential oils are needed in meat models. On the other hand, as aromatic mixtures, essential oils impair the organoleptic properties of meat, i.e. food. Today, studies are focused on finding different strategies in order to enable the use of essential oils in food production, as an alternative to different additives and chemical substances.

Acknowledgment

This study is supported by the Ministry of Science, Technological Development and Innovation of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-47/2023-01/200031).

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

REFERENCES

- Akthar M. S., Degaga B., Azam T. (2014): Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1):001-007.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2):446-475.
- Barbieri C., Borsotto P. (2018): Essential oils: market and legislation. In *Potential of Essential Oils*. Eds. H. A. El-Shemy, IntechOpen, 107-127.
- Böhme K., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P., Aubourg S. P. (2013): Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In *Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives*. Eds. T. G. Villa, P. Veiga-Crespo, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 51-81.
-

- Burt S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3):223-253.
- Chivandi E., Dangarembizi R., Nyakudya T. T., Erlwanger K. H. (2016): Use of essential oils as a preservative of meat. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Ed. V. R. Preedy, Academic Press, 85-91.
- da Silva B. D., Bernardes P. C., Pinheiro P. F., Fantuzzi E., Roberto C. D. (2021): Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.
- Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. (2010): Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10(5):1040-1049.
- Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P. (2011): Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food control*, 22(7):1046-1053.
- Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. (2011): Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9):1908-1914.
- EFSA i ECDC. (2022): The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12):e07666.
- FDA. (2021): Substances generally recognized as safe. Essential oils, oleoresins (solvent free), and natural extractives (including distillates). *Code of Federal Regulations*, 3:21CFR182.20.
- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. (2002): Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International journal of food microbiology*, 73(1):83-92.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008): The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124(1):91-97.
- ISO. (2021): Aromatic natural raw materials – Vocabulary. International Organization for Standardization, ISO 9235.
- Kocić-Tanackov S., Blagojev N., Suturović I., Dimić G., Pejin J., Tomović V., Šojić B., Savanović J., Kravić S., Karabasil N. (2017): Antibacterial activity of essential oils against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 68(4):88-95.
-

- Ljubojević Pelić D., Vidaković Knežević S., Pelić M., Živkov Baloš M., Milanov D. (2021): The epidemiological significance of duck meat as a source of *Salmonella* spp. a review. *World's Poultry Science Journal*, 77(1):105-114.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013): Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12):1451-1474.
- Pan K., Chen H., Davidson P. M., Zhong Q. (2014): Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(7):1649-1657.
- Rao J., Chen B., McClements D. J. (2019): Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, 10:365-387.
- Rios J. L. (2016): Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Ed. V. R. Preedy, Academic Press, 3-10.
- Saad S. M., Shaltout F. A., Abou Elroos N. A., El-nahas S. B. (2019): Antimicrobial effect of some essential oils on some pathogenic bacteria in minced meat. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 2(1):13-21.
- Smith R. L., Cohen S. M., Doull J., Feron V. J., Goodman J. I., Marnett L. J., Portoghese P. S., Waddell W. J., Wagner B. M., Hall R. L., Higley N. A., Lucas-Gavin C., Adams T. B. (2005): A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and chemical toxicology*, 43(3):345-363.
- Šojić B., Ikončić P., Kocić-Tanackov S., Peulić T., Teslić N., Županjac M., Lončarević I., Zeković Z., Popović M., Vidaković S., Pavlić B. (2023). Antibacterial Activity of Selected Essential Oils against Foodborne Pathogens and Their Application in Fresh Turkey Sausages. *Antibiotics*, 12(1):182.
- Stojanović-Radić Z., Pejčić M., Joković N., Jokanović M., Ivić M., Šojić B., Škaljac S., Stojanović P., Mihajilov-Krstev T. (2018). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. *Food Control*, 90:332-343.
- Swamy M. K., Akhtar M. S., Sinniah U. R. (2016): Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 3012462:1-21.
- Turgis M., Han J., Caillet S., Lacroix M. (2009): Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food control*, 20(12):1073-1079.
-

- Velhner M., Velebit B., Todorović D., Pelić M., Vidaković Knežević S., Prunić B., Milanov D. (2020): A brief overview of emergencies and dissemination of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in humans and food producing animals. *Archives of Veterinary Medicine*, 13(2):5-15.
- Vidaković Knežević S., Knežević S., Vranešević J., Kravić S. Ž., Lakićević B., Kocić-Tanackov S., Karabasil N. (2023). Effects of Selected Essential Oils on *Listeria monocytogenes* in Biofilms and in a Model Food System. *Foods*, 12(10):1930.
- Vidaković Knežević S., Kocić-Tanackov S., Kravić S., Knežević S., Vranešević J., Savić Radovanović R., Karabasil N. (2021): In vitro antibacterial activity of some essential oils against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from meat. *Journal of Food Safety and Food Quality*, 72(1):4-11.
- Vidaković S., Vranešević J., Knežević S., Pelić M., Ružić Z., Pajić M., Ljubojević Pelić D. (2020): Microbiological property of raw meat imports in the year 2017. *Veterinary journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, 20(1-2):118-124.
- WHO. (2015): WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization.

Paper received: 05.07.2023.

Paper accepted: 27.09.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301270P

UDK 661.53+553.643]:637.5

Оригинални научни рад**ФОСФАТИ И НИТРИТИ – НАЈЧЕШЋЕ КОРИШЋЕНИ АДИТИВИ У ИНДУСТРИЈИ МЕСА****Биљана ПЕЋАНАЦ¹*, Драго Н. НЕДИЋ², Бојан ГОЛИЋ¹**¹Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Босна и Херцеговина²Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Биљана Пећанац, biljana.pecanac@virs-vb.com

Сажетак

Прехрамбени адитив је свака супстанца која се, без обзира на њену хранљиву вриједност, не користи као храна, нити представља карактеристичан састојак хране, али се из технолошких разлога додаје храни у току производње, прераде, припреме, обраде, паковања, транспорта или чувања, тако да директно или индиректно преко својих међупроизвода постаје или може да постане састојак хране. Захваљујући вишеструкој улози у индустрији меса, најчешће коришћени адитиви су нитрити и фосфати. Према Правилнику о адитивима у храни (Службени гласник Републике Српске, 96/20), максимално дозвољена количина фосфорне киселине и фосфата (Е 338 - Е 452), која се може додати производима од меса појединачно или у комбинацији (изражена као P_2O_5), износи 5 g/kg. У многим студијама спомиње се повезаност између високог уноса фосфатних адитива и разних обољења код човјека. Нитрити су конзерванси који се додају производима од меса ради побољшања квалитета, трајности и безбједности производа и у највећем броју производа од меса не смију се додати у количини већој од 150 mg/kg. Због могућности настајања канцерогених нитрозамина под одређеним условима у производима од меса, постоји потенцијална опасност по здравље људи. Циљ истраживања био је да се одреди садржај резидуалног нитрита и додатих фосфата (изражени као фосфор пентоксид P_2O_5) у производима од меса који потичу са тржишта Републике Српске (Босне и Херцеговине) и усаглашености са захјевима регулативе. Резултати истраживања су показали да су утврђене количине резидуалног нитрита и додатих фосфата биле у оквиру дозвољених граница за додавање у различите категорије и врсте производа од меса према важећој регулативи. То

потврђује адекватну примјену нитрита и фосфата и здравствену исправност производа. У циљу заштите здравља потрошача важно је континуирано праћење употребе фосфата и нитрита у индустрији меса.

Кључне ријечи: адитиви, производи од меса, нитрити, фосфати, опасност по здравље људи.

УВОД

Месо и производи од меса су важни извори енергије и храњивих материја и за људе имају важну улогу у уравнотеженој исхрани. Да су месо и производи од меса играли значајну улогу у исхрани човјека говори дуга историја њихове потрошње, која се може пратити уназад око 3 милиона година (Specht, 2019; McKenna, 2019).

У изради производа од меса користе се бројни адитиви. Прехрамбени адитив је свака супстанца која се, без обзира на њену храњиву вриједност, не користи као храна, нити представља карактеристичан састојак хране, али се из технолошких разлога додаје храни у току производње, прераде, припреме, обраде, паковања, транспорта или чувања, тако да директно или индиректно преко својих међупроизвода постаје или може да постане састојак хране. Захваљујући вишеструкој улози у индустрији меса, најчешће коришћени адитиви су нитрити и фосфати (Milešević и сар., 2022).

Према Правилнику о адитивима у храни (Пропис, 2020), максимално дозвољена количина фосфорне киселине и фосфата (Е 338 - Е 452), која се може додати производима од меса појединачно или у комбинацији (изражена као P_2O_5), износи 5 g/kg. Пошто месо садржи природни фосфор, садржај фосфата у производима од меса у које су додати фосфати укључује и додати и природни фосфор, што се изражава као садржај укупних фосфата. У преради меса и производа од меса, фосфати су неопходни из више разлога као што су: повећање рН вриједности, повећање капацитета задржавања воде (структура мишићног протеина је отворена), већи приноси и стабилизовање емулзије меса, смањење губитка тежине током кувања, побољшање текстуре и сензорних својстава (њажност, сочност, боја, укус), продужење рока трајања итд. (Knipe, 2003; Lampila и Godber, 2002; Molins, 1991; Polak и сар., 2017). Међутим, употреба фосфата у индустрији меса је под озбиљним надзором због све већег интереса за здравију храну и повезаности потрошача који конзумирају синтетске фосфате са здравственим ризицима. Ови „слободни“ (неоргански везани) фосфати се ефикасно апсорбују у гастроинтестиналном

тракту (Glorieux и сар., 2017). Висок унос фосфатних адитива повезан је с кардиоваскуларним морталитетом (Ritz и сар., 2012). Широка употреба фосфатних адитива је такође повезана с додатним узроком неравнотеже калцијума и фосфора (Ling и сар., 2020).

Нитрити су конзерванси који се додају производима од меса ради побољшања квалитета, трајности и безбједности и у највећем броју производа од меса не смију се додати у количини већој од 150 mg/kg (Пропис, 2020). Најчешће се примјењују за саламурење у индустрији меса, а познато је да могу да утичу и на здравље људи. Због канцерогених нитрозамина који у одређеним условима (ниска рН вредност, висока температура) могу да настану у производима од меса, постоји потенцијална опасност по здравље људи (Вуковић, 2012; IARC, 2010; IARC, 2018). Додавањем нитрита, постиже се бољи укус и арома производа, формира се црвено-ружичаста боја меса, као и одговарајућа одрживост и безбједност производа захваљујући њиховом антимикуробном и антиоксидативном дјеловању. Антимикуробни ефекат се заснива на активности недисосоване азотасте киселине која настаје из нитрита и има посебан значај у виду инхибиторног дјеловања на *Clostridium botulinum*, који је познат као узročник ботулизма (Marco и сар., 2006; Sebranek и Bacus, 2007; Ferysiuk и Wójciak, 2020).

Циљ истраживања био је да се утврди садржај резидуалног нитрита и додатих фосфата (изражени као фосфор пентоксид P_2O_5) код производа од меса који потичу са тржишта Републике Српске (Босне и Херцеговине) и усаглашености са захјевима регулативе.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Истраживање је засновано на испитивању садржаја резидуалног нитрита (у даљем тексту нитрити) и додатих фосфата (у даљем тексту фосфати) изражених као фосфор пентоксид (P_2O_5) у различитим производима од меса, систематизованих у неколико категорија и подгрупа према важећем Пропису (2015).

У периоду од августа 2022. до априла 2023. године спроведено је испитивање 120 службених узорака производа од меса, од којих је у 115 узорака испитан садржај нитрита, а у 92 узорка садржај фосфата. Узорци су потицали са територије Републике Српске (Босна и Херцеговина).

По пријему узорака у лабораторију, исти су хомогенизовани, чувани у херметички затвореној посуди на 4°C и анализирани у року од 24 часа од хомогенизације.

Испитивање је спроведено следећим методама:

- садржај укупних фосфата према BAS ISO 13730 (ИСБИХ, 2022),
- садржај протеина према BAS ISO 937 (ИСБИХ, 2007а)
- садржај нитрита методом BAS ISO 2918 (ИСБИХ, 2007б).

Одређивање додатог фосфата (фосфатних адитива) урађено је према математичкој формули примјеном конверзије фосфора израженог као садржај фосфор пентоксид (P_2O_5), којом је предвиђено познавање садржаја укупних фосфата и протеина (FAO/WHO, 2019а; FAO/WHO, 2019б; АБХ, 2015):

Природни фосфат ($mg/kg P_2O_5$) = 250 x количина протеина (%) (1)

Укупни фосфат ($mg/kg P_2O_5$) - природни фосфат ($mg/kg P_2O_5$) = додати фосфати ($mg/kg P_2O_5$)

Резултати добијени у овом истраживању су статистички обрађени, при чему су коришћени основни дескриптивни статистички параметри, а резултати су приказани табеларно.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Оцјена усаглашености према захтјевима Правилника о прехранбеним адитивима (Пропис, 2020), извршена је на основу садржаја додатих фосфата и резидуалног нитрита према Табели 1.

Табела 1 Дозвољене количине резидуалних нитрита и додатих фосфата који се могу додати у производе од меса (Пропис, 2020)

Параметар	Захтјев регулативе
Нитрити (Na-нитрит)	150 mg kg ⁻¹
Фосфати (израшжен као P_2O_5)	5 g kg ⁻¹

Резултати анализа количине протеина (%), укупних фосфата (g kg⁻¹), додатих фосфата (g kg⁻¹) и нитрита приказани су по групама у Табели 2, 3, 4 и на Слици 1 и 2.

У Табели 2 приказани су резултати испитивања нитрита (mg kg⁻¹) у производима од меса по групама према важећем Пропису (2015). Нитрити нису квантификовани у 29% испитаних узорака (Слика 1), који припадају уситњеном обликованом месу-ћевап и ферментисаним сувим трајним кобасицама. У уситњеном обликованом месу-ћевап, овакав резултат је очекиван јер код уситњеног меса није ни дозвољена употреба нитрита.

Веће количине нитрита забиљежене су у термички обрађеним производима, а

мање у трајним производима, што је у сагласности с резултатима испитивања Реџанас и Sladojević (2022). Највећа вриједност натријум нитрита утврђена је у грубо уситњеним бареним кобасицама с утврђеном количином од 68 mg kg^{-1} , док је код фино уситњених барених кобасица забиљежена максимална количина од 46 mg kg^{-1} . Реџанас и Sladojević (2022) су испитивањем садржаја нитрита у 576 производа од меса утврдили 106 mg kg^{-1} нитрита у грубо уситњеној бареној кобасици, а 88 mg kg^{-1} у фино уситњеној бареној кобасици, што је значајно више од резултата добијених у овој студији.

Ковачевић и сар. (2016) утврдили су количину натријум нитрита у различитим производима од меса како слиједи: $7 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$ у сушеној кобасици, $24 \pm 16 \text{ mg kg}^{-1}$ у термички обрађеној кобасици, $37 \pm 23 \text{ mg kg}^{-1}$ у трајном сувомеснатом производу и $42 \pm 21 \text{ mg kg}^{-1}$ у полутрајном сувомеснатом производу. Резултати наших испитивања су у складу с подацима наведеним за ферментисане суве трајне кобасице, значајно нижи за трајне и полутрајне сувомеснате производе, а виши за топлотно обрађене кобасице.

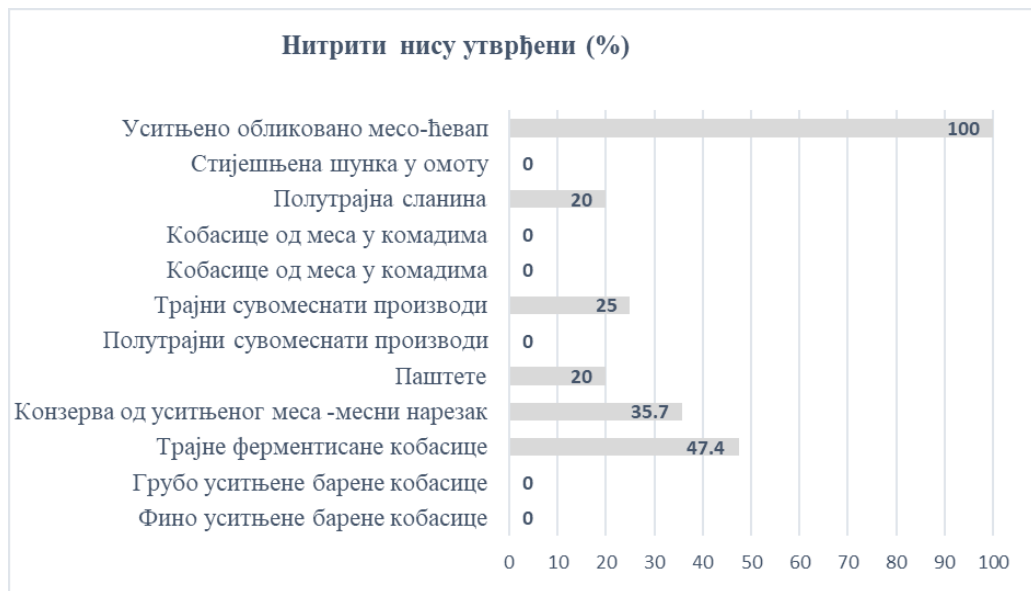
Павлинић Прокурица и сар. (2010) наводе да је познато да се нитрати могу наћи само у оним производима од меса у које су претходно додати нитрити. Реакцијом оксидације, око 20% додатих нитрита прелази у нитрате два сата након процесирања и наставља се током складиштења. Главну улогу у конверзији нитрата у нитрите код сувомеснатих производа од меса има додаток аскорбата или његовог изомера ериторбата додатком натријум-аскорбата као конзерванса, али нитрати настају и без његовог додатка, али у мањој количини код осталих производа од меса.

Табела 2 Резултати испитивања нитрита (mg kg^{-1}) у производима од меса са тржишта Републике Српске приказани по подгрупама

Подгрупа производа од меса	Број узорака	n < LOQ	Средња вриједност $\pm$ SD mg kg^{-1}	Минимално утврђено mg kg^{-1}	Максимално утврђено mg kg^{-1}
Фино уситњене барене кобасице	10	-	34,3 $\pm$ 17,0	7	46
Грубо уситњене барене кобасице	26	-	31,7 $\pm$ 20,5	5	68
Трајне ферментисане кобасице	19	9	5,1 $\pm$ 1,8	2	8
Конзерве од уситњеног меса – месни нарезак	14	5	8,3 $\pm$ 9,2	3	32
Паштете	10	2	16,0 $\pm$ 15,4	2	37
Полутрајни сувомеснати производи	3	-	24,7 $\pm$ 2,0	7	46
Трајни сувомеснати производи	4	1	11,0 $\pm$ 9,6	4	25
Топлотно обрађене кобасице од меса у комадима	2	-	25,5 $\pm$ 0,71	25	26
Полутрајна сланина	5	1	18,5 $\pm$ 22,69	4	52
Уситњено обликовано месо – ћевап	15	15	-	-	-
Стијешњена шунка у омоту	7	-	29,7 $\pm$ 19,47	6	58

п: број узорака у којима нитрити нису квантификовани; LOQ: лимит квантификације је 2 mg kg^{-1} .

На Слици 1 приказан је број узорака у којима нитрити нису квантификовани ($LOQ < 2$).



Слика 1 Заступљеност узорака у којима нису квантификовани нитрити ($LOQ < 2 \text{ mg kg}^{-1}$)

Код сувих кобасица највећи садржај нитрита је у говеђој чајној кобасици (8 mg kg^{-1}), а најмањи у свињској чајној кобасици (2 mg kg^{-1}). Код фино уситњених барених кобасица, највећи садржај нитрита утврђен је у пилећој посебној кобасици (46 mg kg^{-1}), а најмањи у сродном производу од пилећег меса (7 mg kg^{-1}). У грубо уситњеним бареним кобасицама, највећи садржај је у роштиљској кобасици, а најмањи у сродном производу од свињског меса. У полутрајним сувомеснатим производима највећи садржај нитрита је 46 mg kg^{-1} у димљеном врату, а најмањи 7 mg kg^{-1} у димљеној печеници. Код трајних сувомеснатих производа највећи (25 mg kg^{-1}) и најмањи садржај нитрита (7 mg kg^{-1}) утврђен је у сувој печеници. У кокошијој паштети утврђено је највећи садржај нитрита (37 mg kg^{-1}).

У Табели 3 приказани су резултати укупних фосфата, протеина и додатих фосфата по подгрупама производима, а минималне и максималне вриједности садржаја додатих фосфата у Табели 4.

Табела 3 Резултати испитивања протеина, укупних и додатих фосфата (g kg^{-1}) у производима од меса по подгрупама

Подгрупа производа од меса	Протеин %	Min %	Max %	Укупни фосфати g kg^{-1}	Min g kg^{-1}	Max g kg^{-1}	Додати фосфати g kg^{-1}
Фино уситњене барене кобасице (n=10)	11,22±1,04	9,61	12,11	4,44±0,32	4,15	5,04	1,64±0,22
Грубо уситњене барене кобасице (n=22)	15,00±1,95	13,42	18,21	5,70±0,62	4,66	6,32	1,94±0,53
Трајне ферментисане кобасице (n=19)	23,31±2,90	18,55	29,19	5,50±0,83	3,94	7,10	<0,10
Конзерве од уситњеног меса – месни нарезак (n=13)	12,29±5,00	10,55	14,04	5,00±0,69	4,12	6,17	1,90±0,84
Паштете (n=5)	9,82±0,903	9,05	11,39	2,86±0,69	2,32	3,94	<0,10
Полутрајни сувомеснати производи (n=3)	19,36±3,315	15,63	21,96	5,72±0,30	5,37	5,91	0,92±1,04
Трајни сувомеснати производи (n=3)	34,44±2,89	31,11	36,28	7,18±0,53	6,58	7,57	<0,10
Топлотно обрађене кобасице од меса у комадима (n=2)	10,63±1,94	9,25	12,0	4,64±0,38	4,37	4,91	1,99±0,87
Полутрајна сланина (n=5)	17,52±4,35	10,30	21,84	4,20±0,82	3,42	5,37	0,97±0,16
Стијешњена шунка (n=5)	15,00±1,95	13,42	18,21	5,70±0,62	4,66	6,32	1,94±0,54
Јела од меса (n=5)	8,10±1,42	7,41	10,64	1,78±0,26	1,33	1,95	<0,10

LOQ: лимит квантификације 0,10 mg kg^{-1} ; n: број узорака са садржајем нитрита < LOQ

Додати фосфати нису квантификовани у 39% узорака ($< 0,10 \text{ g kg}^{-1}$). У свим узорцима трајних ферментисаних кобасица, паштета, трајних сувомеснатих производа и јела од меса, додати фосфати су испод границе квантификације. Такође, у четири од пет узорака сланине, додати фосфати нису квантификовани. У индустрији меса, фосфати се користе у количинама од 0,05 до 0,5%. Важно је истаћи да је у трајним сувомеснатим производима с високим садржајем протеина, у чијој производњи се ни не користе полифосфати, анализом укупног фосфора утврђен и висок природни ниво фосфора (Марушић и сар., 2012). У истраживању Milešević и сар. (2022), највећи просјечан и највећи садржај укупног фосфора утврђен је у сувомеснатим производима ($6,12 \pm 1,33 \text{ g kg}^{-1}$, $10,64 \text{ g kg}^{-1}$, респективно), што је у сагласности с нашим резултатима. Такође, наши резултати за укупне фосфате у у конзервама од уситњеног меса – месни нарезак ($5,00 \pm 0,69 \text{ g kg}^{-1}$) су веома блиски резултатима Milešević и сар. (2022), чија је просјечна вриједност укупних фосфата $5,79 \pm 1,01 \text{ g kg}^{-1}$. У подгрупи фино уситњених кобасица, највећа количина додатих фосфата утврђена је у сродном производу од пилећег меса ($2,01 \text{ g kg}^{-1}$), док је у грубо уситњеним кобасицама максимална количина утврђена у крањској кобасици ($2,48 \text{ g kg}^{-1}$). У димљеном врату из подгрупе полутрајних сувомеснатих производа, утврђено је највише $2,12 \text{ g kg}^{-1}$ додатих фосфата. Реџапас и Brenjo (2022) су вршили утврђивање фосфата у 247 производа од меса и у 26% производа нису утврдили додате фосфате ($< 0,10 \text{ g kg}^{-1}$). Највећу просјечну вриједност фосфата ($3,09 \pm 1,097 \text{ g kg}^{-1}$), као и највећи утврђени садржај имале су кобасице од меса у комадима, што је у складу с резултатима нашег истраживања. Међутим, у погледу највећег утврђеног садржаја фосфата, резултати нису сагласни с резултатима Реџапас и Brenjo (2022). Исти аутори су у грубо уситњеним кобасицама утврдили најнижи садржај фосфата ($0,26 \text{ g kg}^{-1}$), док је у нашем испитивању најнижа вриједност утврђена у полутрајним сувомеснатим производима.

Табела 4 Минималне и максималне вриједности за садржај додатих фосфата у производима од меса

Категорија	мин g kg ⁻¹	маx g kg ⁻¹
Фино уситњене барене кобасице	1,32	2,01
Грубо уситњене барене кобасице	1,30	2,48
Трајне ферментисане кобасице	<0,10	<0,10
Конзерва од уситњеног меса -месни нарезак	0,62	3,32
Паштете	<0,10	<0,10
Полутрајни сувомеснати производи	0,24	2,12
Трајни сувомеснати производи	<0,10	<0,10
Кобасице од меса у комадима	1,37	2,6
Полутрајна сланина	<0,10	1,08
Стијешњена шунка у омоту	1,3	2,48
Јела од меса	<0,10	<0,10

У конзерви од уситњеног меса-месни нарезак забележен је највећи садржај фосфата (3,32 g kg⁻¹), а у полутрајним сувомеснатим производима најмањи (0,24 g kg⁻¹), што није у складу с резултатима Реџанас и Brenjo (2022). Поменути аутори су најнижу просјечну вриједност фосфата забиљежили у паштетама (0,911±0,485 g kg⁻¹).

Реџанас и Brenjo (2022) су највећу просјечну вриједност садржаја додатих фосфата (3,09±1,097 g kg⁻¹), као и највећи садржај фосфата (4,69 g kg⁻¹), утврдили у кобасицама од меса у комадима, а најмањи у тиролској кобасици (0,26 g kg⁻¹).

Прије употребе било које врсте меса за припрему производа од меса потребно је знати количину фосфора у месу или уситњеном месу за обликовање, како додати синтетички фосфати и полифосфати не би прешли дозвољену границу (Prisa и сар., 2015).

ЗАКЉУЧАК

Спроведеним истраживањем утврђене су количине резидуалног нитрита и додатих фосфата у оквиру дозвољених за додавање у различите категорије и врсте производа од меса према важећој регулативи. То потврђује адекватну примјену нитрита и фосфата и здравствену исправност производа.

Веће количине нитрита забиљежене су у термички обрађеним производима,

а мање у трајним термички нетретираним производима. Нитрити нису квантификовани у 29% испитаних производа од меса, који углавном припадају трајним ферментисаним кобасицама и ћевапима (обликовано мљевено месо). Додати фосфати нису квантификовани у 39% узорака ($< 0,10 \text{ g kg}^{-1}$), који припадају трајним ферментисаним кобасицама, паштетама, трајним сувомеснатим производима, јелима од меса и трајној сланини, што је било и очекивано с обзиром да у производњи неких производа од меса није технолошки оправдана употреба фосфата.

У циљу заштите здравља потрошача важно је континуирано праћење употребе фосфата и нитрита у индустрији меса.

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

ЛИТЕРАТУРА

- АБХ (2015): Смјернице/Водич о фосфору и фосфату, прорачун укупних фосфата и прорачун дозвољених количина у месним производима. Агенција за безбједност хране Босне и Херцеговине.
- FAO/WHO (2019a): Standard for Luncheon Meat. Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation, Codex Alimentarius International Food Standards CXS 89-1981.
- FAO/WHO (2019b): Standard for Cooked Cured Ham. Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation, Codex Alimentarius International Food Standards CXS 96-1981.
- Ferysiuk K, Wójciak K. M. (2020): Reduction of Nitrite in Meat Products through the Application of Various Plant-Based Ingredients. *Antioxidants*, 9(8):711.
- Glorieux S., Goemaere O., Steen L., Fraeye I. (2017): Phosphate Reduction in Emulsified Meat Products: Impact of Phosphate Type and Dosage on Quality Characteristics. *Food Technol Biotechnol.*, 55(3):390-397.
- IARC (2010): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 111-297.
- IARC (2018): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Red Meat and Processed Meat. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 107-422.
-

- ИСБИХ (2007a): Месо и производи од меса – Одређивање садржаја азота. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS ISO 937.
- ИСБИХ (2007b): Месо и производи од меса – Одређивање садржаја нитрита (Референтна метода). Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS ISO 2918.
- ИСБИХ (2022): Месо и производи од меса – Одређивање садржаја укупног фосфора - спектрометријска метода. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS ISO 13730.
- Knipe L. (2003). Phosphates as meat emulsion stabilizers, In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Eds. C. Benjamin. Academic Press, 2077-2080.
- Ковачевић Д., Мастањевић К., Тосић К., Плеадин Ј. (2016): Количина нитрита и нитрата у месним производима с хрватског тржишта. *Месо*, 18(2):40-46.
- Lampila L. E., Godber J. P. (2002): Food Phosphates. In Food Additives - 2nd edition (Chapter 25). Eds. A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Salminen and J. H. Thorngate III. Marcel Dekker, Inc.
- Ling M-P., Huang J-D., Hsiao H-A., Chang Y-W., Kao Y-T. (2020): Risk Assessment of the Dietary Phosphate Exposure in Taiwan Population Using a Total Diet Study. *Foods*, 9(11):1574.
- Marco A., Navarro L., Flores M. (2006): The Influence of Nitrite and Nitrate on Microbial, Chemical and Sensory Parameters of Slow Dry Fermented Sausage. *Meat Science*, 73:660-673.
- Marušić J., Katalenić M., Kozačinski L., Pleadin J., Cvrtila Ž., Stražanac D., Gross-Bošković A. (2012): Polyphosphates in meat and meat products. Scientific opinion. Croatian Food Agency.
- McKenna E. (2019): Meat makes people powerful: a global history of the modern era. *Agric. Hist.*, 93(1):187-189.
- Milešević J., Vranić D., Gurinović M., Korićanac V., Borović B., Zeković M., Šarac I., Milićević D. R., Glibetić M. (2022): The Intake of Phosphorus and Nitrites through Meat Products: A Health Risk Assessment of Children Aged 1 to 9 Years Old in Serbia. *Nutrients*, 14(2):242.
- Molins R. A. (1991): Phosphates in Food. CRC Press, Inc.
- Павлинић Прокурица И., Беварди М., Марушић Н., Видачек С., Коларић Кравар С., Медић Х. (2010): Нитрити и нитрати као прекурсори Н-нитрозамина у паштетама у конзерви. *Месо: Први хрватски часопис о месу*, 12(6):322-332.
-

- Pećanac B., Brenjo D. (2022): The presence of phosphate in meat products from the market of Republic of Srpska In XIV Conference Of chemists, technologists and environmentalists of Republic of Srpska, Book of Proceedings, 148-154.
- Pećanac B., Sladojević Ž. (2022): The presence of nitrite in meat products from the market of Republic of Srpska, In 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, Book of Proceedings, 44-53.
- Polak T., Lušnic Polak M., Tomović V. M., Žlender B., Demšar L. (2017): Characterization of the Kranjska klobasa , a traditional slovenian cooked, cured, and smoked sausage from coarse ground pork. *Journal of food processing and preservation*, 41(6):e13269.
- Prca N., Živkov-Baloš M., Jakšića S., Mihaljev Z., Kartalović B., Ljubojević D., Savić S. (2015): Phosphates as food additives in meat and meat products in North Macedonia. *Procedia Food Science*, 5:243-246.
- Пропис (2015): Правилник о уситњеном месу, полупроизводима и производима од меса. Службени гласник Републике Српске, 46/15.
- Пропис (2020): Правилник о адитивима у храни. Службени гласник Републике Српске, 96/20.
- Ritz E., Hahn K., Ketteler M., Kuhlmann M. K, Mann J. F. E. (2012): Phosphate additives in food – a health risk. *Dtsch Arztebl Int.*, 109(4):49-55.
- Sebranek J. G., Bacus J. N. (2007): Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat science*, 77(1):136-147.
- Specht J. (2019): Red Meat Republic: A Hoof-to-Table History of How Beef Changed America. Princeton University Press.
- Вуковић И. (2012): Основе технологије меса. Ветеринарска комора Србије.

Рад примљен: 26.07.2023.

Рад прихваћен: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301283P

UDK 661.53+553.643]:637.5

Original Scientific Paper

**PHOSPHATE AND NITRITE - THE MOST COMMONLY USED
ADDITIVES IN THE MEAT INDUSTRY**

Biljana PEĆANAC^{1*}, Drago N. NEDIĆ², Bojan GOLIĆ¹

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

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

* Corresponding author: Biljana Pećanac, biljana.pecanac@virs-vb.com

Summary

Food additive is any substance that, regardless of its nutritional value, is not used as food, nor is a characteristic ingredient of food, but is added to food for technological reasons during production, processing, preparation, packaging, transport or storage. Thus, through its intermediate products, it becomes or can become a food ingredient. The most commonly used additives are nitrites and phosphates, due to their multiple role in the meat industry. According to the Regulation on food additives (Official Gazette of the Republic of Srpska, 96/20), the maximum accepted amount of phosphoric acid and phosphate (E 338 - E 452), which can be added to meat products individually or in combination (expressed as P_2O_5), is 5 g/kg. Many studies have confirmed the connection between a high intake of phosphate additives and various diseases in humans. Nitrites are preservatives that are added to meat products in order to improve the quality, durability and safety of the products, and they must not be added in an amount higher than 150 mg/kg in most meat products. Due to the possibility, under certain conditions, of the formation of carcinogenic nitrosamines in meat products, there is a potential danger to human health. The aim of the study was to determine the content of residual nitrite and added phosphates (expressed as phosphorus pentoxide P_2O_5) in meat products originating from the market of Republika Srpska (Bosnia and Herzegovina) and compliance with regulatory requirements. The results showed that the determined amounts of residual nitrite and added phosphates were within the acceptable limits for addition to different categories and types of meat products according to current regulations. This confirms that the application of nitrite and phosphate is adequate and that the product is healthy. In order to protect the health of consumers, it is important to continuously monitor the use of phosphates and nitrites in the meat industry.

Key words: additives, meat products, nitrites, phosphates, human health risk.

INTRODUCTION

Meat and meat products are important sources of energy and nutrients, and have an important role in a balanced diet of human population. Meat and meat products have a significant role in human nutrition, which is evidenced by the long history of their consumption, since it may be traced back about 3 million years (Specht, 2019; McKenna, 2019).

Numerous additives are used in the production of meat products. A food additive is any substance that, regardless of its nutritional value, is not used as food, nor is a characteristic ingredient of food, but is added to food for technological reasons during production, processing, preparation, packaging, transport or storage, so that directly or indirectly through its intermediate products it becomes or can become a food ingredient. Thanks to their multiple role in the meat industry, the most commonly used additives are nitrites and phosphates (Milešević et al., 2022).

According to the Regulation on food additives (Regulation, 2020), the maximum accepted amount of phosphoric acid and phosphate (E 338 - E 452), which can be added to meat products individually or in combination (expressed as P_2O_5), is 5 g/kg. Since meat contains natural phosphorus, the phosphate content in meat products is expressed as the total phosphates content which includes added and natural phosphorus. In the processing of meat and meat products, phosphates are necessary for several reasons such as: increasing the pH value, increasing the water retention capacity (the structure of the muscle protein is open), higher yields and stabilizing the meat emulsion, reducing weight loss during cooking, improving the texture and sensory properties (tenderness, juiciness, color, taste), extension of shelf life, etc. (Knipe, 2003; Lampila and Godber, 2002; Molins, 1991; Polak et al., 2017). However, the use of phosphates in the meat industry is under serious supervision due to the growing interest in healthier foods and the health risks that are related to consumption of synthetic phosphates. These “free” (inorganically bound) phosphates are efficiently absorbed in the gastrointestinal tract (Glorieux et al., 2017). High intake of phosphate additives is associated with mortality caused by cardiovascular diseases (Ritz et al., 2012). Widespread use of phosphate additives is also associated with calcium and phosphorus imbalance (Ling et al., 2020).

Nitrites are preservatives that are added to meat products to improve quality, durability and safety, and in most meat products they must not be added in an amount higher than 150 mg/kg (Regulation, 2020). They are most often used for brining in the meat industry, and they can also affect human health. Due to carcinogenic

nitrosamines that can be formed in meat products under certain conditions (low pH value, high temperature), there is a potential risk for human health (Vuković, 2012; IARC, 2010; IARC, 2018). By adding nitrite, a better taste and aroma of the product is achieved, the red-pink color of the meat is formed, as well as the appropriate sustainability and safety of the product thanks to their antimicrobial and antioxidant action. The antimicrobial effect is based on the activity of undissociated nitric acid, which is formed from nitrite, and has an inhibitory effect against *Clostridium botulinum*, which is known as the cause of botulism (Marco et al., 2006; Sebranek and Bacus, 2007; Ferysiuk and Wójciak, 2020).

The aim of the study was to determine the content of residual nitrite and added phosphates (expressed as phosphorus pentoxide P_2O_5) in meat products originating from the market of Republika Srpska (Bosnia and Herzegovina) and compliance with regulatory requirements.

MATERIALS AND METHODS

The study is based on the determination of the content of residual nitrite (nitrites) and added phosphates (phosphates) expressed as phosphorus pentoxide (P_2O_5) in various meat products, systematized into several categories and subgroups according to the current Regulation (2015).

In the period from August 2022 to April 2023, 120 samples of meat products were tested, of which nitrite content was tested in 115 samples, and phosphate content in 92 samples. The samples came from the territory of Republika Srpska (Bosnia and Herzegovina).

Upon receiving the samples in the laboratory, they were homogenized, stored in a hermetically sealed container at 4°C and analyzed within 24 hours from homogenization.

The test was conducted using the following methods:

- content of total phosphates according to BAS ISO 13730 (ISBIH, 2022),
- protein content according to BAS ISO 937 (ISBIH, 2007a)
- nitrite content according to BAS ISO 2918 method (ISBIH, 2007b).

The determination of added phosphate (phosphate additives) was done according to a mathematical formula using the conversion of phosphorus expressed as phosphorus pentoxide content (P_2O_5). This formula provides the values for content of total phosphates and proteins (FAO/WHO, 2019a; FAO/WHO, 2019b; ABH, 2015):

$$\begin{aligned} \text{Natural phosphate (mg/kg } P_2O_5) &= 250 \times \text{amount of protein (\%)} \quad (1) \\ \text{Total phosphate (mg/kg } P_2O_5) - \text{natural phosphate (mg/kg } P_2O) &= \text{added phosphates (mg/kg } P_2O_5) \end{aligned}$$

The results obtained in this study were statistically processed. Basic descriptive statistical parameters were used. Results were presented in tables.

RESULTS AND DISCUSSION

Assessment of compliance with the requirements of the Regulation on food additives (Regulation, 2020) was carried out based on the content of added phosphates and residual nitrite according to Table 1.

Table 1 Accepted amounts of residual nitrites and added phosphates that can be added to meat products (Regulation, 2020)

Parameter	Regulation requirement
Nitrites (Na-nitrite)	150 mg kg ⁻¹
Phosphates (expressed as P ₂ O ₅)	5 g kg ⁻¹

The results of analyzes of the amount of protein (%), total phosphates (g kg⁻¹), added phosphates (g kg⁻¹) and nitrites are shown, by groups, in Tables 2, 3, 4 and in Figures 1 and 2.

Table 2 shows the results of the nitrite concentrations (mg kg⁻¹) in meat products, by group, according to the current Regulation (2015). Nitrites were not quantified in 29% of the tested samples (Figure 1), and those samples are chopped shaped meat *cevap* and fermented dry sausages. In minced meat-*cevap*, this result is expected because the use of nitrites is not allowed in minced meat.

Higher concentrations of nitrite were detected in thermally processed products, and less in dry products, which is in agreement with the results of the Pećanac and Sladojević (2022). The highest value of sodium nitrite was found in coarse ground sausages and was 68 mg kg⁻¹, while in fine ground sausages the maximum amount was 46 mg kg⁻¹. Pećanac and Sladojević (2022) examined the nitrite content in 576 meat products and determined 106 mg kg⁻¹ of nitrite in coarse ground sausage, and 88 mg kg⁻¹ in fine ground sausage, which is significantly higher than the results obtained in this study.

Kovačević et al. (2016) determined the amount of sodium nitrite in different meat products as follows: 7±4 mg kg⁻¹ in dry sausage, 24±16 mg kg⁻¹ in thermally processed sausage, 37±23 mg kg⁻¹ in dry meat product and 42±21 mg kg⁻¹ in the semi-dry meat product. Our results are in accordance with the data given for fermented dry sausages, significantly lower for dry and semi- dry meat products, and higher for heat-treated sausages.

Pavlinić Prokurica et al. (2010) indicate that nitrates can only be found in those meat products to which nitrites have been previously added. Through the oxidation reaction, about 20% of the added nitrites change to nitrates two hours after processing and this process continue during storage. The conversion of nitrates to nitrites in dry meat products is provoked by the addition of ascorbate or its isomer erythorbate, the addition of sodium ascorbate as a preservative. However, nitrates are also produced without previously mentioned addition, but in smaller quantities, in other meat products.

Table 2 Results of nitrite testing (mg kg^{-1}) in meat products from the market of Republika Srpska shown by subgroups

Subgroup of meat products	Number of samples	n< LOQ	Mean $\pm$ SD mg kg^{-1}	Minimally detected mg kg^{-1}	Maximum detected mg kg^{-1}
Fine chopped sausages	10	-	34.3 ± 17.0	7	46
Coarse chopped sausages	26	-	31.7 ± 20.5	5	68
Dry fermented sausages	19	9	5.1 ± 1.8	2	8
Minced meat cans – canned meat	14	5	8.3 ± 9.2	3	32
Pate	10	2	16.0 ± 15.4	2	37
Semi-dry meat products	3	-	24.7 ± 2.0	7	46
Dry meat products	4	1	11.0 ± 9.6	4	25
Heat-treated meat sausages in pieces	2	-	25.5 ± 0.71	25	26
Semi-dry bacon	5	1	18.5 ± 22.69	4	52
Chopped shaped meat <i>cevap</i>	15	15	-	-	-
Pressed ham in wrapper	7	-	29.7 ± 19.47	6	58

n: number of samples in which nitrites were not quantified; LOQ: limit of quantification is 2 mg kg^{-1} . Figure 1 shows the number of samples in which nitrites were not quantified ($\text{LOQ} < 2$).

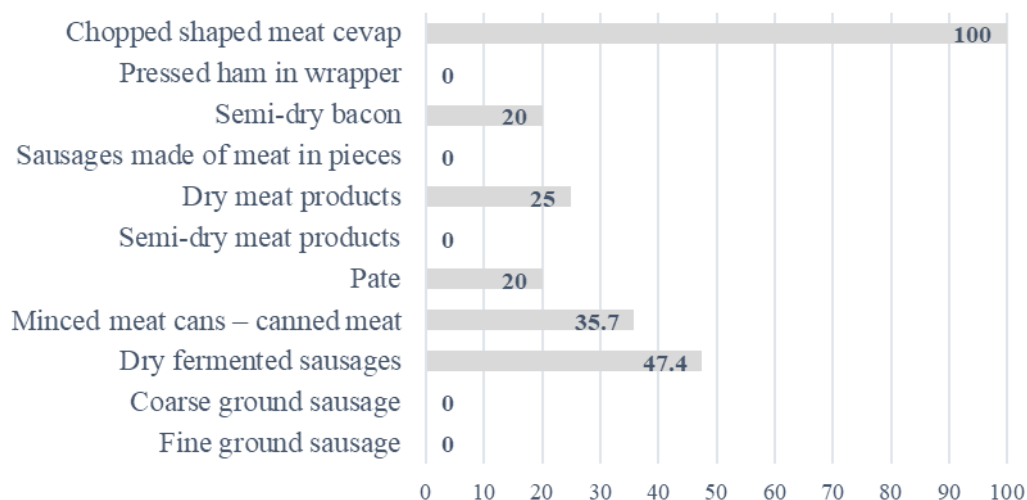
Nitrites were not determined (%)

Figure 1 Percent of samples in which nitrites were not quantified (LOQ < 2 mg kg⁻¹)

In dry sausages, the highest nitrite content is detected in beef tea sausage (8 mg kg⁻¹), and the lowest in pork tea sausage (2 mg kg⁻¹). In fine chopped smoked sausages, the highest nitrite content was determined in chicken special sausage (46 mg kg⁻¹), and the lowest in the similar chicken meat product (7 mg kg⁻¹). In coarse ground sausages, the highest content is detected in the barbecue sausage, and the lowest in the similar pork product. In semi-dry meat products, the highest nitrite content is 46 mg kg⁻¹ in smoked neck, and the lowest is 7 mg kg⁻¹ in smoked sirloin. In dry cured meat products, the highest (25 mg kg⁻¹) and lowest nitrite content (7 mg kg⁻¹) was found in dry sirloin. The highest nitrite content (37 mg kg⁻¹) was found in chicken pate.

Table 3 shows the total phosphates, proteins and added phosphates content by product subgroups, and Table 4 shows the minimum and maximum values of the content of added phosphate.

Table 3 Protein, total and added phosphates content (g kg⁻¹) in meat products by subgroups

Subgroup of meat products	Protein %	Min %	Max %	Total phosphate kg ⁻¹	Min g kg ⁻¹	Max g kg ⁻¹	Added phosphate g kg ⁻¹
Fine chopped sausages (n=10)	11.22±1.04	9.61	12.11	4.44±0.32	4.15	5.04	1.64±0.22
Coarse chopped sausages (n=22)	15.00±1.95	13.42	18.21	5.70±0.62	4.66	6.32	1.94±0.53
Dry fermented sausages (n=19)	23.31±2.90	18.55	29.19	5.50±0.83	3.94	7.10	<0.10
Minced meat cans – canned meat (n=13)	12.29±5.00	10.55	14.04	5.00±0.69	4.12	6.17	1.90±0.84
Pate (n=5)	9.82±0.903	9.05	11.39	2.86±0.69	2.32	3.94	<0.10
Semi-dry meat products (n=3)	19.36±3.315	15.63	21.96	5.72±0.30	5.37	5.91	0.92±1.04
Dry meat products (n=3)	34.44±2.89	31.11	36.28	7.18±0.53	6.58	7.57	<0.10
Heat-treated meat sausages in pieces (n=2)	10.63±1.94	9.25	12.0	4.64±0.38	4.37	4.91	1.99±0.87
Semi-dry bacon (n=5)	17.52±4.35	10.30	21.84	4.20±0.82	3.42	5.37	0.97±0.16
Pressed ham in wrapper (n=5)	15.00±1.95	13.42	18.21	5.70±0.62	4.66	6.32	1.94±0.54
Meat dishes (n=5)	8.10±1.42	7.41	10.64	1.78±0.26	1.33	1.95	<0.10

LOQ: limit of quantification 0.10 mg kg⁻¹; n: number of samples with nitrite content < LOQ

Added phosphates were not quantified in 39% of samples (< 0.10 g kg⁻¹). In all samples of dry fermented sausages, pate, dry cured meat products and meat dishes, added phosphates are below the limit of quantification. Also, in four out of five bacon samples, added phosphates were not quantified. In the meat industry, phosphates are used in amounts of 0.05 to 0.5%. It is important to emphasize that in dry meat products with a high protein content, in which polyphosphates are not even used, a high natural level of phosphorus was determined during the analysis

of total phosphorus (Marušić et al., 2012). In the study done by Milešević et al. (2022), the highest average and highest content of total phosphorus was found in dry meat products ($6.12 \pm 1.33 \text{ g kg}^{-1}$ and 10.64 g kg^{-1} , respectively), which is in agreement with our results. Also, our results for total phosphates in canned minced meat – canned meat ($5.00 \pm 0.69 \text{ g kg}^{-1}$) are very similar to the results of Milešević et al. (2022), who determined $5.79 \pm 1.01 \text{ g kg}^{-1}$ of total phosphates.

In the subgroup of fine chopped sausages, the highest amount of added phosphates was found in the similar chicken meat product (2.01 g kg^{-1}), while in coarse chopped sausages, the maximum amount was found in Carniolan sausage (2.48 g kg^{-1}). A maximum of 2.12 g kg^{-1} of added phosphates was determined in the smoked neck from the subgroup of semi-dry meat products.

Pećanac and Brenjo (2022) determined phosphates in 247 meat products. They did not determine added phosphates ($<0.10 \text{ g kg}^{-1}$) in 26% of products. The highest average value of phosphate ($3.09 \pm 1.097 \text{ g kg}^{-1}$), as well as the highest determined content, was found in sausages made of meat in pieces, which is in accordance with the results of our study. However, regarding the highest determined phosphate content, the results do not agree with the results of Pećanac and Brenjo (2022). The same authors determined the lowest phosphate content (0.26 g kg^{-1}) in coarse chopped sausages, while in our study the lowest value was determined in semi-dry meat products.

Table 4 Minimum and maximum values for the content of added phosphates in meat products

Category	min g kg ⁻¹	max g kg ⁻¹
Fine chopped sausages	1.32	2.01
Coarse chopped sausages	1.30	2.48
Dry fermented sausages	<0.10	<0.10
Minced meat cans – canned meat	0.62	3.32
Pate	<0.10	<0.10
Semi-dry meat products	0.24	2.12
Dry meat products	<0.10	<0.10
Meat sausages in pieces	1.37	2.6
Semi-dry bacon	<0.10	1.08
Pressed ham in wrapper	1.3	2.48
Meat dishes	<0.10	<0.10

The highest content of phosphate (3.32 g kg^{-1}) was determined in minced meat cans – canned meat, and the lowest in semi-dry meat products (0.24 g kg^{-1}), which is not in accordance with the results of Pećanac and Brenjo (2022). The mentioned authors determined the lowest average phosphate value in pâtés ($0.911 \pm 0.485 \text{ g kg}^{-1}$).

Pećanac and Brenjo (2022) determined the highest average value of added phosphates ($3.09 \pm 1.097 \text{ g kg}^{-1}$), as well as the highest content of phosphates (4.69 g kg^{-1}), in sausages made from meat in pieces, and the lowest in Tyrolean sausage (0.26 g kg^{-1}).

Before using any type of meat for the preparation of meat products, it is necessary to know the amount of phosphorus in the meat or chopped meat for shaping, so that the added synthetic phosphates and polyphosphates do not exceed the accepted limit (Prica et al., 2015).

CONCLUSION

The conducted study determined that the amounts of residual nitrite and added phosphates and showed that those are within the limits defined by current regulations meaning that they are allowed for addition to different categories and types of meat products. This confirms the adequate application of nitrite and phosphate and the safety of the product.

Higher concentrations of nitrites were determined in heat-treated products, and less in dry heat-untreated products. Nitrites were not quantified in 29% of the tested meat products, which mainly belong to dry fermented sausages and *cevap* (shaped minced meat).

Added phosphates were not quantified in 39% of samples ($< 0.10 \text{ g kg}^{-1}$), which belong to dry fermented sausages, pates, dry meat products, meat dishes and dry bacon, which was expected considering that in the production of some meat products the use of phosphate is not technologically justified.

In order to protect the health of consumers, it is important to continuously monitor the use of phosphates and nitrites in the meat industry.

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

REFERENCES

- ABH (2015): Guidelines on phosphorus and phosphate, calculation of total phosphates and calculation of permitted amounts in meat products. Food Safety Agency of Bosnia and Herzegovina
- FAO/WHO (2019a): Standard for Luncheon Meat. Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation, Codex Alimentarius International Food Standards CXS 89-1981.
- FAO/WHO (2019b): Standard for Cooked Cured Ham. Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation, Codex Alimentarius International Food Standards CXS 96-1981.
- Ferysiuk K, Wójciak K. M. (2020): Reduction of Nitrite in Meat Products through the Application of Various Plant-Based Ingredients. *Antioxidants*, 9(8):711.
- Glorieux S., Goemaere O., Steen L., Fraeye I. (2017): Phosphate Reduction in Emulsified Meat Products: Impact of Phosphate Type and Dosage on Quality Characteristics. *Food Technol Biotechnol.*, 55(3):390-397.
- IARC (2010): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 111-297.
- IARC (2018): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Red Meat and Processed Meat. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 107-422.
- ISBIH (2007a): Meat and meat products – Determination of nitrogen content. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS ISO 937.
- ISBIH (2007b): Meat and meat products – Determination of nitrite content (reference method). The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS ISO 2918.
- ISBIH (2022): Meat and meat products – Determination of total phosphorus content – spectrometric method. The Institute for Standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS ISO 13730.
- Knipe L. (2003). Phosphates as meat emulsion stabilizers, In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Eds. C. Benjamin. Academic Press, 2077-2080.
- Kovačević D., Mastanjević K. Čosić K., Pleadin J. (2016): Amount of nitrites and nitrates in meat products from the Croatian market. *Meat*, 18(2):40-46.
- Lampila L. E., Godber J. P. (2002): Food Phosphates. In Food Additives - 2nd edition (Chapter 25). Eds. A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Salminen and J. H. Thorngate III. Marcel Dekker, Inc.
-

- Ling M-P., Huang J-D., Hsiao H-A., Chang Y-W., Kao Y-T. (2020): Risk Assessment of the Dietary Phosphate Exposure in Taiwan Population Using a Total Diet Study. *Foods*, 9(11):1574.
- Marco A., Navarro L., Flores M. (2006): The Influence of Nitrite and Nitrate on Microbial, Chemical and Sensory Parameters of Slow Dry Fermented Sausage. *Meat Science*, 73:660-673.
- Marušić J., Katalenić M., Kozačinski L., Pleadin J., Cvrtila Ž., Stražanac D., Gross-Bošković A. (2012): Polyphosphates in meat and meat products. Scientific opinion. Croatian Food Agency.
- McKenna E. (2019): Meat makes people powerful: a global history of the modern era. *Agric. Hist.*, 93(1):187-189.
- Milešević J., Vranić D., Gurinović M., Korićanac V., Borović B., Zeković M., Šarac I., Milićević D. R., Glibetić M. (2022): The Intake of Phosphorus and Nitrites through Meat Products: A Health Risk Assessment of Children Aged 1 to 9 Years Old in Serbia. *Nutrients*, 14(2):242.
- Molins R. A. (1991): Phosphates in Food. CRC Press, Inc.
- Pavlinić Prokurica I., Bevardi M., Marušić N., Vidaček S., Kolarić Kravar S., Medić H. (2010): Nitrites and nitrates as precursors of N-nitrosamines in canned liver patties *Meat: First Croatian Meat Journal*, 12(6):322-332.
- Pećanac B., Brenjo D. (2022): The presence of phosphate in meat products from the market of Republic of Srpska In XIV Conference Of chemists, technologists and environmentalists of Republic of Srpska, Book of Proceedings, 148-154.
- Pećanac B., Sladojević Ž. (2022): The presence of nitrite in meat products from the market of Republic of Srpska, In 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, Book of Proceedings, 44-53.
- Polak T., Lušnic Polak M., Tomović V. M., Žlender B., Demšar L. (2017): Characterization of the Kranjska klobasa , a traditional slovenian cooked, cured, and smoked sausage from coarse ground pork. *Journal of food processing and preservation*, 41(6):e13269.
- Prica N., Živkov-Baloš M., Jakšića S., Mihaljev Z., Kartalović B., Ljubojević D., Savić S. (2015): Phosphates as food additives in meat and meat products in North Macedonia. *Procedia Food Science*, 5:243-246.
- Regulation (2015): Regulation on minced meat, semi-finished and finished meat products. The Official Gazette of Republic of Srpska, 46/15.
- Regulation (2020): Regulation on food additives. Official Gazette of Republic of Srpska, 96/20.
- Ritz E., Hahn K., Ketteler M., Kuhlmann M. K., Mann J. F. E. (2012): Phosphate additives in food – a health risk. *Dtsch Arztebl Int.*, 109(4):49-55.
-

- Sebranek J. G., Bacus J. N. (2007): Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat science*, 77(1):136-147.
- Specht J. (2019): Red Meat Republic: A Hoof-to-Table History of How Beef Changed America. Princeton University Press.
- Vuković I. (2012): Meat Technology – basic principles. The Veterinary Chamber of Serbia.

Paper received: 26.07.2023.

Paper accepted: 15.09.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301295B

UDK 636.234.09:616.7-001

Прегледни научни рад

PATOGENEZA LAMINITISA MLEČNIH KRAVA

**Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Sreten NEDIĆ¹, Sveta ARSIĆ¹, Ivan VUJANAC¹,
Radiša PRODANOVIĆ¹, Aleksandra MITROVIĆ¹, Miloje ĐURIĆ¹,
Dejan BUGARSKI², Nikolaos K. PANOUSIS³, Emmanouil KALAITZAKIS³,
Milan NINKOVIĆ⁴**

¹Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

²Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad, Srbija

³Aristotelov Univerzitet, Fakultet veterinarske medicine, Solun, Grčka

⁴Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

*Korespondentni autor: Jovan Bojkovski, bojkovski@vet.bg.ac.rs

Sažetak

Hromost je najraniji ali i najvažniji klinički simptom oboljenja akropodijuma goveda. Prema literaturnim podacima u 90% slučajeva uzrok hromosti je lokalizovan u papcima, a u 10% slučajeva je u drugim anatomskim delovima ekstremiteta. Patološki proces je u 88% slučajeva ispoljen na zadnjim ekstremitetima. Laminitis predstavlja aseptično zapaljenje korijuma papaka. Kao uzroci nastanka ovog oboljenja, pored mehaničkog preopterećenja papaka, navode se i toksični uzroci. Duže davanje lako svarljive koncentrovane hrane, stvaranje acidoze u buragu, nagla promena hrane, posebno ishrana zelenim ječmom, ovsem, sveže pokošenim mladim leguminozama i ishrana plesnivom hranom, mogu dovesti do pojave laminitisa. Laminitis je često rezultat uticaja velikog broja činioca, kao što su metabolički i digestivni poremećaji, porođaj stres, mastitis, metritis, dislokacija sirišta, ležište bez ili sa vrlo malo prostirke, nemogućnost kretanja, pregojenost i loš menadžment ishrane. Obrok koji dovodi do acidoze dovodi i do laminitisa. Takav obrok je vrlo težak za korekciju, kada se najveći procenat hraniva u obroku sastoji od ugljenohidratnih materija. Smatra se da vazoaktivne materije (histamin), koje ulaze u krvotok iz buraga, dovode do oštećenja korijuma papaka. Metabolički poremećaj nastaje usled niskog pH sadržaja buraga i lančano dolazi do patofizioloških poremećaja, koji na kraju rezultuju ishemijom korijuma papaka i klinički manifestnim laminitisom (odlaganjem nogu zbog bola, a ponekad i prinudnog ležanja). Veruje se da osim histamina i bakterijski endotoksini, mlečna kiselina i druge biološki aktivne

materije doprinose nastanku ovog oboljenja. Primena osnovnih principa ishrane muznih krava mogu prevenirati pojavu laminitisa samim tim i pojavu ekonomskih gubitaka usled hromosti.

Ključne reči: mlečne krave, laminitis, patogeneza.

UVOD

Intenzivan uzgoj goveda obuhvata čitav niz tehnoloških postupaka koji treba da omoguće kontinuiranu proizvodnju i optimalno korišćenje proizvodnih kapaciteta. Kod visoko mlečnih krava, metabolički poremećaji kao što su ketoza, sindrom masne jetre, puerperalna pareza, acidoza buraga i laminitis su posledica uticaja mnogih činilaca, kao što su neizbalansirana ishrana, loši uslovi držanja i nege. Profilaksa metaboličkih poremećaja se obavlja ishranom, koja treba da bude usklađena prema proizvodnom obroku i proizvodnoj kategoriji, uz kontrolu zdravlja krava (Šamanc i sar., 2005).

Laminitis predstavlja aseptičko zapaljenje korijuma papaka (Panousis i Karatzias, 1999; Bojkovski i sar., 2000; Radojičić i sar., 2017). Kod nastanka ovog oboljenja, pored mehaničkog preopterećenja papaka, navode se i toksični uzroci i nastanak na alergijskoj osnovi (Bojkovski i sar., 2007; Bojkovski i sar., 2011a). Duže davanje lako svarljive koncentrovane hrane, stvaranje acidoze u buragu, nagle promene hrane, posebno ishrana zelenim ječmom, ovsem, sveže pokošenim mladim leguminozama i ishrana plesnivom hranom, mogu dovesti do pojave laminitisa (Radojičić i sar., 2008). Laminitis je često rezultat uticaja velikog broja činilaca kao što su metabolički i digestivni poremećaji, porođaj, stres, mastitis, metritis, ležište bez ili sa vrlo malo prostirke i nemogućnost kretanja, pregojenost i neadekvatan menadžment ishrane (Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017; Bojkovski i sar., 2013). Smatra se da vazoaktivne materije (histamin) koje ulaze u krvotok iz buraga, dovode do oštećenja korijuma (Šamanc i sar., 2005). Metabolički poremećaj nastaje usled niskog pH sadržaja buraga i lančano dovodi do patofizioloških poremećaja, koji na kraju rezultuju ishemijom korijuma papaka i klinički manifestnim laminitisom (odlaganjem noge zbog bola, a ponekad i prinudnog ležanja). Veruje se da osim histamina, bakterijski endotoksini, mlečna kiselina i druge biološki aktivne materije doprinose nastanku ovog oboljenja. Količina koncentrovane hrane koju krava unese obrokom, povremeno nizak pH sadržaja buraga i pojava lokomotornih poremećaja imaju zajedničku etiopatogenetsku pozadinu (Peterse, 1996; Radojičić i sar., 2017).

Uloga kisele indigestije u nastanku laminitisa

U etiologiji kisele indigestije učestvuju sledeći činioci: velika količina kiselog voluminoznog hraniva u odnosu na količinu i kvalitet sirovih vlakana, neuravnoteženi odnos između lako svarljivih ugljenih hidrata i voluminoznog hraniva i velika količina koncentrovanih hraniva koja sadrže znatno veće količine lako svarljivih ugljenih hidrata (Šamanc, 2009; Radojičić i sar., 2017). Ustanovljeno je da se pri vrednosti pH 3,9-4,5 blokira histaminaza, koja je aktivna samo pri normalnom ili slabo baznom pH. U tom slučaju acidoza se vrlo brzo komplikuje intoksikacijom histamina. Karakteristično je da histamin povećava propustljivost sluznice, pa dolazi do njegovog prolaska u krv. Kao što je poznato, histamin može da izazove pad pritiska i kolapsno stanje. Kod uznapredovalih kiselih indigestija su opisani slučajevi komatoznog stanja, pri čemu životinje leže bespomoćno sa podignutim prednjim nogama i glavom savijenom prema grudnom košu (Linford, 1990; Garry, 1990). Kod takvih krava, pored histaminske izražena je i acetilholinska intoksikacija. U kiseloj sredini acetilholin je stabilniji, a holinesteraza je neaktivna, pa se povećava koncentracija endogenog acetilholina iz sadržaja buraga. Proces se odvija brzo kao kod anafilaktičkog šoka, usled sinergičnog delovanja histamina i acetilholina, dok je kod acidoze buraga reč o delovanju endogenog i egzogenog histamina i acetilholina. U početku bolesti nastaje povećana motorička aktivnost buraga, a kasnije nastaje pareza, paraliza zidova buraga odnosno potpuno prestaje motorička aktivnost buraga (Owens i sar., 1998; Bojkovski i sar., 2000).

Acidoza, nastala zbog nakupljanja mlečne kiseline u suvišku, je fermentativni poremećaj, koji se manifestuje u više oblika, zavisno od visine disbalansa. U osnovi, do acidoze buraga dolazi pri ishrani visoko rastvorljivim ugljenohidratnim hranivima, tj. kada se seno brzo, pod uticajem mikroorganizama razgrađuje u buragu. Pad pH vrednosti sa 6,8 do vrednosti oko 5 u buragu inhibiše određene grupe mikroorganizama (protozoe i Gram-negativne bakterije), a pospešuje razvoj onih bakterija koje zahtevaju kiselu sredinu. Tako npr. prisustvo većeg broja *Streptococcus bovis* i *Lactobacillus sp.*, mikroorganizama koji proizvode mlečnu kiselinu, dalje snižava kiselost. Ako je životinja dugo na ovakvoj ishrani odnosno eneregetskom obroku, acidoza može dovesti do oštećenja sluznice buraga, što omogućava bakterijama nastajanje ruminitisa. Nastaju komplikacije kao što je peritonitis, oštećenje jetre nastalo prelaskom infektivnih agenasa u krvotok i posledično laminitis. Manje važni simptomi mogu da nastanu kao jednostavno odbijanje hrane, koje se kasnije nastavlja u prežderavanje, što može dovesti do atonije buraga i nakupljanja viška tečnosti u buragu. Ovo zajedno sa viškom tečnosti u buragu rezultuje znacima kao što su dehidracija, smanjen apetit, smanjenje

proizvodnje mleka, smanjenje kontrakcija buraga, povremeno suva balega, koja može da se nastavi u dijareju. Cilj treba da bude da u preveniranju obezbedimo ravnotežu između mikroorganizama. Ovo se može postići ishranom određenih količina hrane date u ravnomernim intervalima, izbegavajući nagle promene ka visoko energetske obrocima. Adekvatne količine koncentrata i kvalitetne kabaste hrane su neophodni da bi se ovi ciljevi ostvarili (Bojkovski i sar., 2000; Bojkovski i sar., 2007; Šamanc, 2009; Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017).

Uloga ishrane u patogenezi laminitisa

Zadatak ishrane visoko mlečnih krava je da obezbedi, pre svega, dobro zdravlje i odgovarajuću kondiciju životinje, laktaciju u trajanju od oko 300 dana, kao i veći broj laktacija tokom eksploatacije, maksimalnu količinu mleka optimalnog hemijskog sastava i donošenje na svet zdravog i vitalnog telea jednom godišnje (Radojičić i sar., 2008; Đorđević Marković i sar., 2009). Da bi visoko mlečna krava mogla da odgovori na ovakve zahteve, uslovi njenog držanja, nege, zdravstvenog stanja, a pre svega ishrane, moraju da budu maksimalno prilagođeni potrebama organizma (obrok usklađen prema proizvodnji mleka) i dovedeni do granice idealnog, u okviru mogućnosti savremenog govedarstva (Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017). Greške koje se dese u poslednjoj trećini graviditeta, postaju jasno uočljive i izražene tokom puerperijuma. Jedna od najčešćih grešaka koje mogu da se pojave jesu različiti oblici tehnopatija, među kojima je najznačajnija ketoza. S metaboličkog aspekta, ketoza je poremećaj metabolizma ugljenih hidrata i masti, pri čemu je blokirana β -oksidacija masnih kiselina, a proces se zaustavlja na nivou acetyl-CoA. Presudnu raskrnicu mnogih puteva u inetrmedijarnom metabolizmu, pa i u tokovima resinteze glukoze i razgradnje masnih kiselina, predstavlja oksalacetat. S obzirom da je proces sinteze glukoze maksimalno aktiviran, najveća količina oksalacetata je "zarobljena" i "sprovedena" put glukoneogeneze. Zbog toga dolazi do nakupljanja veće količine acetyl-CoA, koji ne može da bude u potpunosti oksidisan, te dolazi do spajanja dva molekula acetyl-CoA i sinteze prvog ketonskog tela, acetosirćetne kiseline, a iz nje i β -oksibuterne kiseline i acetona. Sinteza ketonskih tela, u okviru fizioloških granica, odvija se i kod zdravih životinja intenzitetom od 25 $\mu\text{g/h}$. Većina tkiva je u stanju da koristi ketonska tela kao izvor energije, a stepen njihove razgradnje proporcionalan je koncentraciji u krvi do nivoa od 3,44 mmol/L. Ketonska tela se u suvišku nakupljaju u krvi, a zatim se izlučuju urinom i mlekom, a manjim delom i preko pluća. Izlučivanjem ketonskih tela organizam, koji se već nalazi u energetske deficitu, dodatno gubi veliku količinu energije. U ketonskim telima još uvek je vezano oko 75% energetske vrednosti masti.

Sumirajući navedena razmatranja, nužno je pažnju usmeriti prema ishrani, koja se svojim značajem ističe u profilaksi i terapiji ovog metaboličkog poremećaja. Subklinička ketoza može se pratiti i redovnom kontrolom parametara metaboličkog profila, koji uključuju i neke analize procene funkcionalnog statusa ćelija jetre (koncentracija glukoze, aktivnost AST, ukupni bilirubin i albumini). Validnom interpretacijom dobijenih analiza moguće je jetru hepatoprotektivima zaštititi, a ketozu preduprediti (Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017; Šamanc, 2009). Izuzetno visoke potrebe krava s visokom proizvodnjom mleka uslovljavaju upotrebu veće količine koncentrovanih hraniva s posledičnim smanjenjem sadržaja sirovih vlakana. Da bi obrok mogao da odgovori nutritivnim zahtevima životinje u proizvodnji, preporučuje se da se izbegavaju kabasta hraniva s visokim sadržajem vode (silaza sa manje od 25% SM, celulozna hraniva). Zbog prevelike voluminoznosti ovakvih hraniva, odnosno male količine energije i hranljivih materija po jedinici mase, krava nije u stanju da konzumira dovoljnu količinu za podmirenje osnovnih potreba (Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017, Šamanc, 2009). Kao hranivo izbora ističe se dobro i kvalitetno seno (livadsko, leptirnjača, mešavine) koje može da se daje po volji, a koncentrovani deo obroka, prilagođen proizvodnom statusu, treba podeliti na više delova, kako bi se postiglo ravnomernije pristizanje ugljenih hidrata u burag i njihovo razlaganje pod dejstvom mikroflore, a izbegla ili bitno umanjila mogućnost nastanka acidoze buraga sa svim posledicama. Ovakvim načinom ishrane se izbegava pojava "pikova" glikemije koja je neizbežna kod ishrane visokomlečnih krava hranjenih pretežno koncentrovanim hranivima (Šamanc i sar., 2005; Bojkovski i sar., 2000; Radojičić i sar., 2017).

Poseban problem u planiranju obroka predstavlja usklađivanje odnosa pojedinih vrsta ugljenih hidrata koja životinja unosi obrokom. Potrebno je da se istakne značaj celuloze, ali i skroba, kao prekursora propionske kiseline i ključnog medijatora glukoneogeneze, dok učešće lako svarljivih ugljenih hidrata, iako predstavljaju "instant energiju", nosi sa sobom stalni rizik nastanka metaboličkih poremećaja.

Parametar o kom treba voditi računa je i dnevna konzumacija hrane, što posebno predstavlja problem u uslovima stresa i drastičnih fizioloških promena u toku kasnog graviditeta, partusa i rane laktacije. Generalno gledano, obroci bi trebalo da budu ukusni i primamljivi za kravu, očuvanih organoleptičkih svojstava, higijenski ispravni i bez štetnih primesa. Mehanizam kontrole obroka obuhvata kratkotrajnu kontrolu (pH sadržaja buraga, količina isparljivih masnih kiselina i nivoi nekih hormona kao što su insulin, glukagon, gastrin) i dugotrajnu kontrolu konzumacije (fiziološko stanje, status azota, faktori spoljašnje sredine, fotoperiodičnost i sezonske razlike, stepen proizvodnje i ukupne potrebe u energiji). Od značaja su i telesna masa krava, genetska osnova, zdravstveno stanje, konkurentski nagoni

većeg prioriteta (termoregulacija), kao i faktori vezani za ukusnost i primamljivost obroka (Đorđević Marković i sar., 2009; Radojičić i sar., 2017).

U uslovima obilne neizbalansirane ishrane u prepartalnom periodu dolazi do deponovanja viška hranjivih materija u telesnim depozitima i do takozvanog "sindroma masne jetre". U uslovima energetskeg deficita i posledične ubrzane mobilizacije masti iz depozita, što je česta pojava kod ugojenih krava, isuviše brzo je nakupljanje slobodnih masnih kiselina u krvi i njihovo deponovanje u jetri. Visoka koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi uslovljava pad apetita, odnosno životinja reaguje smanjenjem konzumacije, što onda dovodi do energetskeg deficita, kada krave naglo mršave, s mogućim letalnim ishodom. U jetri nastaje nakupljanje masnih kiselina u vidu masne infiltracije ili degeneracije hepatocita. S takvim dodatnim opterećenjem, jetra gubi na funkcionalnoj aktivnosti, što doprinosi nastanku ketoze, odnosno otežani su reparacioni i restitucionni procesi u hepatocitima, jer se potpuno ozdravljenje ostvaruje tek kada se jetra oslobodi viška masti, što je spor i dugotrajan proces (Šamanc, 2009; Radojičić i sar., 2017). "Sindrom masne jetre" je, primer energetskeg disbalansa izazvanog preteranim konzumiranjem hrane/energije i povećanim taloženjem masti u hepatocitima, ali i u drugim tkivima kao što je potkožno tkivo, pa se često koristi i termin "sindrom masne krave". Kada krava tokom poslednjeg perioda laktacije i zasušenog perioda prima visoko energetske obroke, dolazi do skladištenja masti. Ovo stanje ima uticaja i na pojavu teških teljenja, zaostajanje posteljice ili čak na pojavu metritisa. Kada se ispolji gubitak apetita, nastaje ubrzana mobilizacija masti iz telesnih rezervi i posledično pojačano formiranje ketonskih tela. Zajedničko za sva stada sa ovakvom ishranom je da imaju problema s plodnošću, što se odražava dugim servis periodima i smanjenom koncepcijom (Đoković, 2010). Stada s dugim intervalima između teljenja, obično u vreme teljenja imaju krave u tojnoj kondiciji (Radojičić i sar., 2008). Ketoza je jedno od sekundarnih oboljenja koja se javljaju u ovakvim uslovima. Potrebno je metabolički profil, kao meru otkrivanja subkliničkih ketoza, sprovoditi najmanje dva puta godišnje kod krava u visokom graviditetu i u ranoj laktaciji (Radojičić i sar., 2017). Ciljevi kojima treba težiti u cilju prevencije sindroma masne jetre su obezbeđenje adekvatnih, nepreterano energetski bogatih obroka, kako bi se pripremili mikroorganizmi buraga za obroke koji će slediti u laktaciji, dajući zasušenim kravama 2-3 kg ovih hraniva dve nedelje pre teljenja. Posle teljenja koncentrat treba povećavati za 1kg/dan, sve do postizanja pika proizvodnje. Neophodno je davati 2-4 kg sena dnevno, radi smanjenja fluktuacije mikroorganizama, što se može javiti tokom promene koncentracije obroka, kao posledica visokih potreba u ranom periodu laktacije. Poželjno je održavati interval između teljenja u periodu od 12 do 13 meseci, odnosno godina/tele, odvojiti zasušene krave od krava u laktaciji

u cilju da se smanji mogućnost pojave “синдрома масне јетре”, а да се одржи висока лактација (Ђорђевић Марковић и сар., 2009; Радојићић и сар., 2008.; Радојићић и сар., 2017).

Код крава храниених оброчима с високим садржајем лако растворљивих протеина (17% протеина са 75% растворљивости) може доћи до потребе већег броја осеменјаванја и продужаванја циклуса између телjenja, што се још назива синдромом неплодности. Као последица овакве исхране јавља се висок садржај амонijака у бурaгу, који се излучује преко мокраће или преко млека. Јон амонijака у сувишку делује тоksiчно на ембрион и спречава имплантацију и развој фетуса. Стога је потребно избегавати исхрану с високим количинама протеина, посебно лако растворљивих протеина и обезбедити потребне количине енергије усклађеним односом протеини:енергија (Радојићић и сар., 2008; Радојићић и сар., 2017).

Потребе микроорганизама у аминокиселинама и енергији, као и распон pH у бурaгу (од 5,5 до 6,8) треба узети у обзир при одређивању најбољег оброка код високо млечних крава у лактацији. Превенција подразумева равнотежу између микроорганизама, која се може постићи исхраном одређених количина хране date у равномernим интервалима, избегавајући нагле промене ка високо енергетским оброчима. Адекватне количине концентрата и квалитетне кабасте хране су неопходни да би се ови циљеви остварили (Ноcek, 1997; Ђорђевић Марковић и сар., 2009; Радојићић и сар., 2017).

Као последица поремећаја промета минералних материја (недовољно уношење или повећан губитак) јесте појава пuerпералне парезе, односно хипокалцемije или млечне грознице. Код крава са пuerпералном парезом, пад нивоа калцијума (хипокалцемija) манифестује са општом слабошћу, »падом с ногу«, понекад комом и угинућем, ако се овај настали поремећај благовремено не лећи. Код крава с пuerпералном парезом испољавaju се и поремећаји у виду индигестije и сманјене апсорпције хранљивих материја. Чиниоци који доприносе појави хипокалцемije су сманjenje могућности код старијих крава да брзо мобилишу калцијум из костју или пак ресорпцију из tankih creva, а сманjenje апетита које наступа након телjenja даље продубљује овај проблем (Радојићић и сар., 2017; Недић и сар., 2023).

Disbalans минералних материја непосредно после телjenja и то код старијих високо млечних крава, доводи најчешће до такозване типичне хипокалцемije али неретко и до атипичне пuerпералне парезе, код које је доминантан пад нивоа фосфора, и/или још ређе до “синдрома лежеће краве” (Недић и сар., 2023).

Профилакса и препоруке у овом смислу се односе и на повећану пажњу у начину држања и исхране у засушеном периоду. Због тога, до три недеље пре телjenja високо steоне краве треба постепено преводити и навикавати на оброк крава у лактацији, у циљу да се микроорганизми бурaга »припреме и развију« за услове новог оброка, као и у оброк пред засушење додавати једнак однос или чак нешто више фосфора него

kalcijuma, kako bi se blagovremeno pokrenula mobilizacija kalcijuma iz rezervi (Đorđević Marković i sar, 2009). Takođe je moguća i priprema kiselog ili anjonskog obroka. Takav obrok smanjuje pojavu mlečne groznice i to putem određenog zakiseljavanja, koje maksimizuje jonizaciju kalcijuma u crevima i poboljšava njegovu apsorpciju, a verovatno poboljšava i mogućnost transporta i usvajanje kalcijuma iz kostiju. Još jedna od mera koja se može preduzeti je dodavanje obroku vitamina D, ukoliko je tačno poznat termin teljenja. Dodavanje vitamina D u čestim davanjima nije preporučljivo, pogotovo ne injekcioni preparat, jer vitamin D ima strukturu i katabolizam sličan steroidnim hormonima, što može imati loše posledice po stanje hepatocita, koji su inače značajno oštećeni kod visoko mlečnih krava hranjenih neizbalansiranim obrocima (Radojičić i sar., 2017).

Obroci s niskom količinom kalcijuma par nedelja pred teljenje preveniraju pojavu puerperalne pareze prepartalnom aktivacijom koštanog sistema i intestinalnog kanala. Preporučuje se da se dve nedelje pred teljenje koristi obrok sa manje od 80g Ca, 60g P i oko 35.000 IU vitamina D. Veoma je važno rešiti pitanje izbora hraniva siromašnih u kalcijumu i sastavljanje adekvatnog obroka, koji podmiruje ostale potrebe životinje u poslednjim nedeljama zasušenja. Kao hraniva izbora koriste se krompir i sporedni proizvodi od krompira, ostala korenasto-krtolasta hraniva, pivski trop, sačma od kukuruznih klica, mekinje i stočno brašno. Neposredno posle teljenja, kada je potrebno da se životinjama ponudi obrok bogat u kalcijumu, u obzir mogu doći repini rezanci, seno i silaža (trave, leptirnjače), kao i dodavanje mineralnih hraniva kao izvora kalcijuma. Praktičan nedostatak ovakvog režima ishrane je neophodnost da se obrok posle teljenja menja postepeno, jer je poznato da nagle promene obroka mogu kod preživara izazvati poremećaj mikroorganizama i dovesti do indigestija. Praktična iskustva pokazuju da na pojedinim farmama postoje slučajevi puerperalne pareze bez izrazite hipokalcemije, ali s ozbiljnom hipomagnezijemijom. Nedostatak magnezijuma pokazuje se kao značajan etiološki činilac u nastajanju puerperalne pareze, remeteći homeostazu kalcijuma, zato što smanjuje stepen mobilizacije kalcijuma posle teljenja, a s obzirom da je mobilizacija magnezijuma iz depoa znatno sporija od mobilizacije kalcijuma, često se javljaju simptomi koji podsećaju na pašnu tetaniju (Linford, 1990; Peterse, 1996; Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017).

Patogeneza laminitisa

U svim dosadašnjim razmatranjima etiologije i patogeneze laminitisa, kao jedan od važnih predisponirajućih činilaca, pogotovo na početku bolesti, pominju se anatomske karakteristike krvnih puteva korijuma, koji je stešnjen između falangealne

kosti i rožine papaka. U tako ispunjenom prostoru ne postoji mogućnost širenja u slučaju izlaska tečnosti u intersticijum, a to je jedan od najranijih poremećaja koji nastaje kao posledica delovanja histamina na vaskularne elemente korijuma papaka. Pojačana transudacija, a kasnije i eksudacija, uzrokuju povećanje tkivnog pritiska koji još više otežava cirkulaciju krvi u laminama i prouzrokuje njihovu ishemiju. Ovo je sasvim razumljivo ako se ima u vidu neelastičnost rožine koja ne može da se širi pod pritiskom nastalog otoka korijuma papaka. U ovoj fazi, laminitis prati temperiranost i bolnost obolelog papka i visok stepen šepavosti od samog početka bolesti. Listovi korijuma papaka, kojih ima oko 1.300 u svakom papku, uski su i veoma nežne građe. Dobro su snabdeveni krvlju i u njima ima dosta arteriovenskih anastomoza. U tkivu korijuma se rasprostire bogata mreža nervnih pleksusa, jer, kako je poznato, papci nisu samo mehanička potpora telu, već predstavljaju specifičan taktilni organ (učestvuju u održavanju ravnoteže i kretanju). Drugi činoci koji su pomenuti, kao što su telesna masa, stanje uhranjenosti, nasledne i stečene anomalije, mogu da odigraju određenu ulogu u patogenezi aseptičnog pododermatitisa. Poremećaji u cirkulaciji, ishemija i hipoksija, prouzrokuju degenerativne promene korijuma i oštećenje lamina. Kada proces poprimi hroničan tok, može da nastane promena položaja falangealne kosti, deformacija papaka i probijanje vrha kosti kroz tabanski deo papka. To su mehanička oštećenja usled pritiska lamine korijuma, poremećaja u cirkulaciji i nastalih nekrotičnih procesa. U vezi s ovim su mnogobrojne promene koje nastaju kasnije, kao što su zadebljanje tabanskog dela papaka (dupli taban), krvarenja u tabanskom delu, ponekad pojava krvnih podliva. U nekim slučajevima promene u boji tabanskog dela karakterišu ovaj proces. Uočavaju se bleđa polja često prošarana hiperemičnim područjima ili mnogobrojnim hemoragijama (Šamanc i sar., 2005; Bojkovski i sar., 2011b; Radojičić i sar., 2008; Radojičić i sar., 2017). Profilaktičke mere u cilju sprečavanja proizvodnih bolesti visoko mlečnih krava treba prvenstveno da omoguće fiziološku aktivnost mikroorganizama sadržaja buraga u momentu kada zasušena krava uđe u laktaciju. Zahteva se izbalansirana ishrana prema proizvodnom obroku, razdvajanje zasušenih krava od krava u laktaciji, redovna kontrola metaboličkog profila, kao jednog od načina kontrole zdravlja, kao i da se zasušenim kravama omogućiti davanje dovoljne količine kabaste hrane najmanje dve nedelje pre teljenja (Ivanov i sar., 2005; Đoković, 2010).

ZAKLJUČAK

Laminitis predstavlja aseptično zapaljenje korijuma papaka. Kao uzroci nastanka ovog oboljenja, pored mehaničkog preopterećenja papaka, navode se i toksični uzroci i nastanak na alergijskoj osnovi. Duže davanje lako svarljive koncentrovane hrane, stvaranje acidoze u buragu, nagla promena hrane, posebno ishrana zelenim ječmom, ovsem, sveže pokošenim mladim leguminozama i ishrana plesnivom hranom, mogu dovesti do pojave laminitisa. Laminitis je često rezultat uticaja velikog broja činioca, kao što su metabolički i digestivni poremećaji, porođajni stres, mastitis, metritis, ležište bez ili sa vrlo malo prostirke, nemogućnost kretanja, pregojenost i neadekvatan menadžment ishrane. Obrok koji dovodi do acidoze dovodi i do laminitisa i vrlo je težak za korekciju, kada se najveći procenat hraniva u obroku sastoji od ugljenohidratnih materija. Smatra se da vazoaktivne materije (histamin) koje ulaze u krvotok iz buraga, dovode do oštećenja korijuma papaka. Metabolički poremećaj nastaje usled niskog pH sadržaja buraga i lančano dolazi do patofizioloških poremećaja, koji na kraju rezultuju ishemijom korijuma papaka i klinički manifestnim laminitisom (odlaganjem nogu zbog bola, a ponekad i prinudnog ležanja). Veruje se da osim histamina, bakterijski endotoksini, mlečna kiselina i druge biološki aktivne materije doprinose nastanku ovog oboljenja. Količina koncentrovane hrane koju krava unese obrokom, povremeno nizak pH sadržaja buraga i pojava lokomotornih poremećaja, imaju zajedničku etiopatogenetsku pozadinu. U nastajanju laminitisa primarnu ulogu ima acidoza buraga. Izbalansiranim obrocima daje se prednost u sprečavanju nastajanja laminitisa. Pridaje se veliki značaj u korišćenju mineralnih materija s puferskim delovanjem na elektrohemijsku reakciju sadržaja buraga.

Zahvalnica

Rad je podržan sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-47/2023-01/200143).

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

LITERATURA

- Bojkovski J., Đoković R., Borozan S., Pudlo P. (2007): Prilog poznavanju kliničke patologije buraga visoko-mlečnih krava. *Savremena Poljoprivreda*, 56(3-4):80-86.
- Bojkovski J., Hadžić I., Rogožarski D., Pavlović I., Savić B., Đedović S. (2013): Contribution to knowledge laminitis by dairy cows in Serbia. *Lucrări stiințifice medicină veterinară*, 47(4):24-32.
- Bojkovski J., Relić R., Savić B., Petrujkić T. (2011b): Metabolic parameters and welfare of dairy cows. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, 68 (1):48-54.
- Bojkovski J., Šamanc H., Damnjanović Z. (2000): Kisela indigestija goveda. *Symposium Clinica Veterinaria*, 246-249.
- Bojkovski J., Savić B., Relić R., Petrujkić T. (2011a): Prilog poznavanju aseptičkog pododermatitisa mlečnih krava. *Veterinarski Žurnal Republike Srpske*, 11(1):53-58.
- Đoković R. (2010): Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu. *Agronomski fakultet Čačak*.
- Đorđević Marković M., Grubić G., Jokić Ž. (2009): Ishrana domaćih i gajenih životinja, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 611-654.
- Garry F. B. (1990): Indigestion in ruminants. In large animal internal medicine: Ed. Smoth B. Mosby Company, 760-763.
- Ivanov I., Šamanc H., Vujanac I., Dimitrijević B. (2005): Metabolički profil krava. 4. Simpozijum "Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda", 241-247.
- Linford R. (1990): Laminitis. In large animal internal medicine Ed. Smoth B. Mosby Company, 1158-1168.
- Nedić S., Prodanović R., Bojkovski J., Arsić S., Vujanac I. (2023): Diferencijalna dijagnostika sindroma ležeće krave. 44. Seminar za inovacije znanja veterinara, Zbornik predavanja, 135-143.
- Nocek J. E. (1997): Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.*, 80(5):1005-28.
- Owens F. N., Secrust D. S., Hill W. J., Gill D. R. (1998): Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.*, 76(1):275-286.
- Panousis N., Karatzias H. (1999): Laminitis in dairy cows. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 50(3):206-211.
- Peterse D. J. (1996): Foot laminitis. In Bovine medicine: Diseases and Husbandry of Cattle. Eds. Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R. G. Blackwell science, 353-363.
-

- Radojičić B., Bojkovski J., Jonić B., Ćutuk R. (2017): Bolesti preživara, II izdanje. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
- Radojičić B., Bojkovski J., Petrujkić T., Marković R., Šefer D. (2008): Proizvodne bolesti visoko-mlečnih krava. *Biotehnology in animal husbandry*, 24:563-575.
- Šamanc H. (2009): Bolesti organa za varenje goveda, Naučna knjiga.
- Šamanc H., Adamović M., Vujanac I., Bojkovski J. (2005): Uloga kisele indigestije u etiopatogenezi aseptičkog pododermatitisa goveda. 4. Simpozijum "Isхрана, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda", 307-313.

Рад примљен: 27.10.2023.

Рад прихваћен: 23.11.2023.



DOI 10.7251/VETJEN2301307B

UDK 636.234.09:616.7-001

Review scientific paper

PATHOGENESIS OF LAMINITIS IN DAIRY COWS

**Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Sreten NEDIĆ¹, Sveta ARSIĆ¹, Ivan VUJANAC¹,
Radiša PRODANOVIĆ¹, Aleksandra MITROVIĆ¹, Miloje ĐURIĆ¹,
Dejan BUGARSKI², Nikolaos K. PANOUSIS³, Emmanouil KALAITZAKIS³,
Milan NINKOVIĆ⁴**

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

²Scientific Veterinary Institute, Novi Sad, Serbia

³The Faculty of Veterinary Medicine of the Aristotle University,
Thessaloniki, Greece

⁴Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Jovan Bojkovski, bojkovski@vet.bg.ac.rs

Summary

The lameness is the earliest but also the most important clinical symptom of the achropodium diseases in cattle. According to literary data, in 90% of cases, the cause of lameness is localized in the hooves, and in 10% of cases it is in other anatomical parts of the limb. In 88% of cases, the pathological process has been manifested at the hind limb. Laminitis is an aseptic inflammation of the corium of the hooves. In addition to the mechanical overloading of the hooves, the toxic causes are also addressed as the causes of this disease. Longer feeding with rapidly digested concentrate, rumen acidosis, sudden change of food components, especially diet with green barley, oat, freshly harvested young legumes and nutrition with molded food, can lead to laminitis. Laminitis is often the result of impact of a large number of factors, such as metabolic and digestive disorders, calving stress, mastitis, metritis, abomasal displacement, bedding without or with very little straw, inability to move, obesity and poor diet. The ration that leads to acidosis also leads to laminitis. Such a ration is difficult to correct in a case when the carbohydrates are present in highest percentage. Vasoactive substances (histamine), which enter the bloodstream from rumen, are considered to lead to damage of the hoof corium. Metabolic disorder is caused by a low pH of rumen, which leads to pathophysiological disorders, which eventually result in the ischemia of the hoof corium and clinically manifest laminitis (leg disposal due to pain, and sometimes forced lying). In addition to histamine and bacterial endotoxins, milk acids and

other biologically active substances are believed to contribute to the onset of this disease. The application of basic principles of the nutrition of the lactating cows can prevent the appearance of laminitis and therefore the appearance of economic losses due to lameness.

Key words: lactating cows, laminitis, pathogenesis.

INTRODUCTION

An intensive cattle breeding includes numerous technological procedures that should provide sustainable production and optimal use of production capacity. Metabolic disorders in high yielding dairy cows, such as ketosis, fatty liver syndrome, puerperal paresis, rumen acidosis and laminitis are caused by a large number of factors, including non-balanced diet and poor breeding conditions. The prophylaxis of metabolic disorders may be done by nutrition, which should be in accordance with the production diet and category of animal combined with the cow's health control (Šamanc et al., 2005).

Laminitis is an aseptic inflammation of the hoof corium (Panousis and Karatzias, 1999; Bojkovski et al., 2000; Radojičić et al., 2017). In addition to the mechanical overloading of the hoof, the toxic agents as well as allergic reaction, may cause this disease (Bojkovski et al., 2007; Bojkovski et al. 2011a). Longer feeding with rapidly digested concentrate, rumen acidosis, sudden change of food components, especially diet with green barley, oat, freshly harvested young legumes and nutrition with molded food, can lead to laminitis (Radojičić et al. 2008). Laminitis is often the result of the impact of a numerous factors such as metabolic and digestive disorders, calving, stress, mastitis, metritis, bedding without or with very little straw and inability to move, obesity and poor diet (Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017; Bojkovski et al., 2013). Vasoactive substances (histamine) that enter the bloodstream from rumen are considered to provoke the damage of the hoof corium (Šamanc et al., 2005). Metabolic disorder may be caused by a low pH of rumen, which leads to pathophysiological disorders, which eventually result in the ischemia of the hoof corium and clinically manifest laminitis (leg disposal due to pain, and sometimes forced lying). In addition to histamine, bacterial endotoxins, milk acid and other biologically active substances are believed to contribute to the onset of this disease. The amount of concentrates in ration, occasionally low rumen pH and the appearance of locomotor disorders have a common ethiopathogenetic background (Peterse, 1996; Radojičić et al., 2017).

The role of rumen acidosis in the etiology of laminitis

Following factors are involved in the etiology of rumen acidosis: a large amount of acidic voluminous feeds with low acidogenic value compared to the high content of high quality fiber, an unbalanced ratio between rapidly digested carbohydrates and voluminous nutrients and a large amount of concentrates containing significant amounts of rapidly digested carbohydrates (Šamanc, 2009; Radojičić et al., 2017). It has been found that pH 3.9-4.5 blocks histaminesis, which is active only when pH is neutral or poorly alkaline. In this case, acidosis is very quickly complicated by the histamine intoxication. Histamine increases the permeability of mucous membranes, so it passes into the blood. As already known, histamine can cause decrease in blood pressure and collapse. In severe rumen acidosis, cases of coma are described, with animals lying with front legs raised and head bent toward the chest (Linford, 1990; Garry, 1990). In addition to histamine intoxication, those cows also express acetylcholine intoxication. In the acidic environment, acetylcholine is more stable, and holinesterase is inactive, so the concentration of endogenous acetylcholine that originate from the rumen content is increased. The process develop quickly as in the case of anaphylactic shock, due to the synergistic action of histamine and acetylcholine, while in the rumen acidosis there is action of endogenous and exogenous histamine and acetylcholine. At the beginning of the disease, the increased rumen motility occurs, but thereafter the paralysis and paralysis of the rumen walls, or completely ceases of the rumen activity occurs (Owens et al., 1998; Bojkovski et al., 2000).

Acidosis, caused by the accumulation of lactic acid in excess, is a fermentative disorder, which may be expressed in several forms, depending on the level of the imbalance. Basically, rumen acidosis occurs because of consumption of rapidly digested carbohydrates, i.e. when hay is quickly broken down in the rumen under the influence of microorganisms. A decrease in the rumen pH value from 6.8 to 5 inhibits certain groups of microorganisms (protozoa and Gram-negative bacteria), and promotes the development of those bacteria that require an acidic environment. Thus, for example, the presence of a greater number of *Streptococcus bovis* and *Lactobacillus sp.*, microorganisms that produce lactic acid, further decrease acidity. If the animal is on this type of diet or energy feed for a long time, acidosis can lead to damage to the lining of the rumen, which allows bacteria to develop ruminitis. Complications, such as peritonitis, liver damage caused by the transfer of infectious agents into the bloodstream, and subsequently laminitis, arise. Less important symptoms can arise, like a simple refusal of food, which later continues into overeating, which can lead to atony of the rumen and accumulation of excess

fluid in the rumen. This, together with the excess fluid in the rumen, results in signs such as dehydration, reduced appetite, reduced milk production, reduced rumen contractions, occasionally dry manure, which can continue into diarrhea. The goal should be to ensure, during prevention, a balance between microorganisms. This can be achieved by offering specific amounts of food given at regular intervals, avoiding sudden changes towards high energy diets. Adequate amounts of concentrate and high quality forage are necessary to achieve these goals (Bojkovski et al., 2000; Bojkovski et al., 2007; Šamanc, 2009; Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017).

The role of nutrition in the pathogenesis of laminitis

The main goal related to high-yielding dairy cows nutrition is to ensure, first of all, good health and adequate condition of the animal that should be in lactation about 300 days. Also, cow should deliver a healthy and vital calf once annually, have a numerous of lactations during lifespan as well as the maximum amount of milk with an optimal chemical composition (Radojičić et al., 2008; Đorđević Marković et al., 2009). In order for a high-yielding dairy cows to be able to respond to those demands, the breeding, health conditions, and, above all, nutrition, must be adjusted to the cow's needs (meaning that nutrition should be adjusted to milk production) and brought to the limit of the ideal, within the possibilities of modern cattle farming (Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017). Mistakes that are done in the last three months of pregnancy become clearly visible and expressed during the puerperium. The most common mistakes that can occur are various forms of technopaties, among which the most significant is ketosis. From a metabolic point of view, ketosis is a disorder of carbohydrate and fat metabolism, in which β -oxidation of fatty acids is blocked, and the process stops at the level of acetyl-CoA. Oxaloacetate represents the crucial intersection of many pathways in intermediary metabolism, including glucose resynthesize and fatty acid breakdown. Given that the process of glucose synthesis is maximally activated, the largest amount of oxaloacetate is "captured" and "conducted" through gluconeogenesis. This leads to the accumulation of a larger amount of acetyl-CoA, which cannot be fully oxidized. Thus, two acetyl-CoA molecules join together and the synthesis of the first ketone body, acetoacetic acid, occurs and consequently synthesis of both β -oxybutyric acid and acetone. Synthesis of ketone bodies, within physiological limits, also occurs in healthy animals at an intensity of 25 $\mu\text{g/h}$. Most tissues are able to use ketone bodies as a source of energy, and the degree of their decomposition is proportional to the concentration in the blood up to the level of 3.44 mmol/L. Ketone bodies accumulate in excess in the blood, and are then excreted in urine and milk, and to

a lesser extent through the lungs. By excreting ketone bodies, the body, which is already in an energy deficit, additionally loses a large amount of energy. About 75% of the energy value of fat is bound in ketone bodies.

Summarizing the above considerations, it is necessary to focus on nutrition, which stands out for its importance in the prophylaxis and therapy of this metabolic disorder. Subclinical ketosis can also be monitored by metabolic profile parameters control, which include some analyses to assess the function of liver cells (glucose concentration, AST activity, total bilirubin and albumins). With a valid interpretation of the obtained analyses, it is possible to protect the liver with hepatoprotective agents and prevent ketosis (Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017; Šamanc, 2009).

The extremely high needs of high-yielding dairy cows require a larger amount of concentrates with a consequent reduction in the crude fibres content in feed. In order for the ration to be able to meet the nutritional requirements of the animal in production, it is recommended to avoid forage with high water content (silage with less than 25% DM, cellulosic feeds). Due to the excessive voluminousness of such nutrients, i.e. the small amount of energy and nutrients per unit mass, the cow is not able to consume a sufficient amount of food to satisfy basic needs (Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017, Šamanc, 2009). Good and high-quality hay (meadow and alfalfa hay as well as mixtures) stands out as the feed of choice, which can be given *ad libitum*, and the concentrated part of the diet, adapted to the production status, should be divided into several parts, in order to achieve a more even use of carbohydrates in the rumen and their decomposition under the influence of microflora. Thus, the possibility of developing rumen acidosis with all its consequences is avoided or significantly reduced. This type of feeding avoids the occurrence of “peaks” of glycemia, which is usual when high-yielding dairy cows are fed with concentrates (Šamanc et al., 2005; Bojkovski et al., 2000; Radojičić et al., 2017).

A special issue in nutrition plan is harmonizing the ratio of different types of carbohydrates that the animal consumes. It is necessary to emphasize the importance of cellulose, but also starch, as a precursor of propionic acid as a key mediator of gluconeogenesis, while the participation of rapidly digested carbohydrates, although they represent “instant energy”, carries with it a constant risk of metabolic disorders.

An important parameter is the daily food consumption, which is especially an issue during stress and dramatic physiological changes that occur during late pregnancy, parturition and early lactation. In general, the diet should be tasty, with preserved organoleptic properties, hygienically correct and without harmful contaminants.

The nutrition control includes short-term control (pH of rumen contents, amount of volatile fatty acids and levels of some hormones such as insulin, glucagon, gastrin) and long-term control of consumption (physiological state, nitrogen status, environmental factors, photoperiodicity and seasonal differences, level of production and total energy needs). Cow body mass, genetic basis, health status, competitive instincts of higher priority (thermoregulation), as well as factors related to the palatability of the diet are also important.

In conditions of unbalanced nutrition in the prepartal period, excess nutrients are stored in body and the so-called “fatty liver syndrome” occurs. In conditions of energy deficit and the consequent accelerated fat mobilization from the body stores, which is a frequent in obese cows, the accumulation of free fatty acids in the blood and liver occurs. A high concentration of free fatty acids in the blood causes a appetite depression, which means that the animal reduce consumption, which then leads to an energy deficit, when cows suddenly lose weight, with a possible fatal outcome. Accumulation of fatty acids occurs in the liver in the form of fatty infiltration or degeneration of hepatocytes. With such an additional load, the liver loses its activity, which contributes to the emergence of ketosis, meaning that the reparation and restitution processes in hepatocytes are hindered, since healing is achieved only when the liver is free from excess fat, which is a slow and long-term process (Šamanc, 2009; Radojičić et al., 2017). “Fatty liver syndrome” is an example of an energy imbalance caused by excessive food/energy consumption and increased fat deposition in hepatocytes, but also in other tissues such as subcutaneous tissue. Therefore, the term “fat cow syndrome” is often used. When a cow receives high-energy diet during the late lactation and the dry period, fat storage occurs. This condition leads to difficult calving, placental abruption or even the occurrence of metritis. When a loss of appetite occurs, there is an accelerated mobilization of fat from the body’s stores and, consequently, there is an increased ketone bodies synthesis. Herds with this diet have fertility problem, which is reflected in long service periods and reduced conception (Đoković, 2010). Herds with long intervals between calving usually have obese cows at the time of calving (Radojičić et al., 2008). Ketosis is one of the secondary diseases that occur in these conditions. In order to diagnose subclinical ketosis, it is necessary to obtain a metabolic profile at least twice a year in cows that are in late pregnancy and in early lactation (Radojičić et al., 2017). The goals to be achieved, in order to prevent fatty liver syndrome, are the provision of adequate, not highly energy-rich diets, in order to prepare the rumen microorganisms for the diets that will be offered during lactation. This means that dry cows should receive 2-3 kg of these nutrients two weeks before calving. After calving, the concentrate should be increased by 1 kg/day, until peak

of lactation is reached. It is necessary to offer to cows 2-4 kg of hay per day, in order to reduce the fluctuation of microorganisms, which can occur during changes in the concentrate content in diets, as a result of high needs in the early period of lactation. Interval between calving should be from 12 to 13 months, meaning year/calf. Also, it is necessary to separate dry from lactating cows in order to reduce occurrence of “fatty liver syndrome” and to maintain high lactation (Đorđević Marković et al., 2009; Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017).

Cows fed rations with a high content of easily soluble proteins (17% protein with 75% solubility) may require more inseminations and may have prolonged cycle between calving. This is called infertility syndrome. As a consequence of this diet, rumen has a high content of ammonia, which is excreted through urine or milk. Ammonia ion in excess has a toxic effect on the embryo and prevents implantation and development of the fetus. Therefore, it is necessary to avoid a diet with high amounts of protein, especially easily soluble proteins, and provide the necessary amounts of energy with a balanced protein:energy ratio (Đorđević Marković et al., 2009; Radojičić et al., 2017).

The requirements of microorganisms in amino acids and energy, as well as the range of pH in the rumen (from 5.5 to 6.8) should be taken into account when determining the best ration for high-yielding dairy cows. Prevention implies a balance between microorganisms, which can be achieved by offering certain amounts of food at equal intervals, and avoiding sudden changes to high-energy diets. Adequate quantities of concentrates and high quality forage are necessary to achieve these goals (Nocek, 1997; Đorđević Marković et al., 2009; Radojičić et al., 2017).

As a consequence of a mineral metabolism disorder (insufficient intake or increased loss) a puerperal paresis, also known as hypocalcemia or milk fever, occurs. The decrease in calcium levels (hypocalcemia) in cows with a puerperal paresis is associated with general weakness, “inability to rise up”, sometimes followed by a coma and death, if this disorder is not treated on time. In cows with a puerperal paresis, there are also disorders like indigestion and reduced absorption of nutrients. The factors that contribute to the onset of hypocalcemia, like a decreased mobilisation of calcium from bone or absorption from small intestine in older cows, and the postpartal reduction of the appetite, further complicate this problem (Radojičić et al. 2017; Nedić et al., 2023).

Dysbalance of minerals immediately after calving, in older high-yielding dairy cows, usually leads to so-called typical hypocalcemia, but also to atypical puerperal paresis, which is dominantly characterized by decreased phosphorus levels, and/or less often to the “Downer cow syndrome” (Nedić et al., 2023).

Prophylaxis and recommendations also relate to the breeding and feeding cows during

dry period. Because of this, up to three weeks before calving the high-yielding dairy cows should be gradually prepared to get used to the lactation cow's diet, in order for the rumen microorganisms to "prepare and develop" for the conditions of a new diet. Also, an equal ratio or even more phosphorus than calcium should be given in the diet before drying cows, in order to start a calcium mobilisation from stores (Đordjević Marković et al., 2009). It is also possible to prepare an acid or anion diet. Such a diet reduces the appearance of milk fever through a certain acidification, which maximizes the ionization of calcium in the guts, improves its absorption, and improves the transportation of calcium from the bones. Another measure that can be taken, if the term of the calving is known, is a vitamin D supplementation. The frequent vitamin D supplementation is not advisable, especially in the form of the injection, because vitamin D has a structure and catabolism similar to steroid hormones, which can affect the hepatocytes, which are significantly damaged in high-yielding dairy cows fed with unbalanced diets (Radojičić et al., 2017).

Diets with low calcium level, few weeks before calving, may prevent puerperal paresis by prepartal activation of the bones and intestinal channels. It is recommended that the two weeks before calving, diet with less than 80g Ca, 60g P and about 35,000 IU of vitamin D should be applied. It is very important to solve the issues related to choosing of diets with poor calcium levels and composing an adequate diet, which meets the requirements of the animal in the last weeks of dry period. Potatoes and its by products as well as other root and tuber crops, brewer's spent grain, corn germ meal, bran and wheat flour are nutrients of choice. Immediately after calving, when it is necessary to offer animals a diet rich in calcium, tail noodles, hay and silage (meadow and alfalfa hay), as well as the addition of mineral nutrients as a source of calcium are used. A practical disadvantage of such a diet regime is the need to gradually change a diet after calving, because it is known that sudden diet change can cause a disorder of microorganisms and lead to rumen acidosis. Practical experiences show that there are cases of puerperal paresis on some farms without pronounced hypocalcemia, but with serious hypomagnesiemia. Magnesium deficiency is shown as a significant etiological factor in the emergence of puerperal paresis, disrupting calcium homeostasis, because it reduces the degree of mobilization of calcium after calving, and given that the mobilization of magnesium from the stores is much slower than the mobilization of calcium, there are often symptoms that seemed like grass tetany (Linford, 1990; Peterse, 1996; Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017).

Patogenesis of laminitis

As one of the important predisposing factors of the etiology and pathogenesis of laminitis, especially at the beginning of the disease, is the anatomical characteristic of the blood vessels of the corium, which is narrowed between the phalangeal bone and the corium of hoof. In such a fulfilled space, there is limited expansion in the case of fluid leaking into the interstitium. This is one of the earliest disorders of the hoof corium vascular elements caused by histamine. Increased transudation and exudation increase tissue pressure that further complicates blood circulation in the laminae and causes their ischemia. This is a result of the inelasticity of the cornea, which cannot expand under the pressure of the swelled hoof corium. In this phase, laminitis is accompanied with increased temperature and pain of the affected hoof, as well as with a high degree of lameness from the very beginning of the disease. The laminae of the hoof, about 1,300 in each hoof, are narrow and very soft in structure. They are well supplied with blood and there are many arteriovenous anastomoses in them. A rich network of nerve plexuses spreads in the corium tissue, because, as is known, hooves are not only mechanical support for the body, but are a specific tactile organ (maintaining balance and movement). Other factors that have been mentioned, such as body weight, nutritional status, genetic and acquired anomalies, may play a certain role in the pathogenesis of aseptic pododermatitis. Circulation disorders, ischemia and hypoxia, cause degenerative changes in the corium and lamina. When the process takes a chronic course, there may be a change in the position of the phalangeal bone, deformation of the hooves and the protrusion of the tip of the bone through the sole of the hooves. These are mechanical damages due to the lamina corium pressure, disturbances in circulation and necrosis. Related to this, there are numerous changes that occur later, such as thickening of the sole of the hoof (double sole), bleeding in the sole, sometimes the appearance of blood bruises. In some cases, changes in the color of the soles characterize this process. Pale areas often interspersed with hyperemic fields or numerous hemorrhages are observed (Šamanc et al., 2005; Bojkovski et al., 2011b; Radojičić et al., 2008; Radojičić et al., 2017). Prophylactic measures aimed to prevent production diseases in high-yielding dairy cows should primarily enable the physiological activity of the rumen microorganisms at the moment when the dry cow enters lactation. Balanced diet according to the production ration is required, as well as separation of dry from lactating cows and regular control of the metabolic profile. It is also important to feed dry cows with a sufficient amount of forage at least two weeks before calving (Ivanov et al., 2005; Đoković, 2010).

CONCLUSION

Laminitis is an aseptic inflammation of the corium of the hooves. In addition to mechanical overloading of the hooves, the toxic causes are also addressed as the causes of this disease. Longer feeding with rapidly digested concentrate, rumen acidosis, sudden change of food components, especially diet with green barley, oat, freshly harvested young legumes and nutrition with molded food, can lead to laminitis. Laminitis is often the result of impact of a large number of factors, such as metabolic and digestive disorders, calving stress, mastitis, metritis, abomasal displacement, bedding without or with very little straw, inability to move, obesity and poor diet. The ration that leads to acidosis also leads to laminitis. Such a ration is difficult to correct in a case when the carbohydrates are present in highest percentage. Vasoactive substances (histamine), which enter the bloodstream from rumen, are considered to lead to damage of the hoof corium. Metabolic disorder is caused by a low pH of rumen, which leads to pathophysiological disorders, which eventually result in the ischemia of the hoof corium and clinically manifest laminitis (leg disposal due to pain, and sometimes forced lying). In addition to histamine and bacterial endotoxins, milk acids and other biologically active substances are believed to contribute to the onset of this disease. The application of basic principles of the nutrition of the lactating cows can prevent the appearance of laminitis. Great importance is given to the use of mineral substances with a buffering effect on the electrochemical reaction of rumen contents.

Acknowledgement

The study is supported by the Ministry of science, technological development and innovation of Republic of Serbia (Contract number 451-03-47/2023-01/200143).

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

REFERENCES

- Bojkovski J., Đoković R., Borožan S., Pudlo P. (2007): Contribution to the knowledge of clinical pathology of rumen in high yielding dairy cows. *Contemporary Agriculture*, 56(3-4):80-86.
- Bojkovski J., Hadžić I., Rogožarski D., Pavlović I., Savić B., Đedović S. (2013): Contribution to knowledge laminitis by dairy cows in Serbia. *Lucrări științifice medicină veterinară*, 47(4):24-32.
- Bojkovski J., Relić R., Savić B., Petrujkić T. (2011b): Metabolic parameters and welfare of dairy cows. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, 68 (1):48-54.
- Bojkovski J., Šamanc H., Damnjanović Z. (2000): Rumen acidosis in cattle. *Clinica Veterinaria Symposium*, 246-249.
-

- Bojkovski J., Savić B., Relić R., Petrujkić T. (2011a): Contribution to the knowledge of dairy cows aseptic pododermatitis. *Veterinarski Žurnal Republike Srpske*, 11(1):53-58.
- Doković R. (2010): Endocrine status of dairy cows during peripartal period. Faculty of Agronomy in Čačak.
- Đorđević Marković M., Grubić G., Jokić Ž. (2009): Nutrition of domestic and breeding animals, University of Belgrade, Agriculture Faculty, 611-654.
- Garry F. B. (1990): Indigestion in ruminants. In large animal internal medicine: Ed. Smoth B. Mosby Company, 760-763.
- Ivanov I., Šamanc H., Vujanac I., Dimitrijević B. (2005): Metabolic profile in cows. 4. Symposium "Nutrition, reproduction and health protection in cattle", 241-247.
- Linford R. (1990): Laminitis. In large animal internal medicine Ed. Smoth B. Mosby Company, 1158-1168.
- Nedić S., Prodanović R., Bojkovski J., Arsić S., Vujanac I. (2023): Diferential diagnosis of downer syndrome in cows. 44. Inovation Seminar for Veterinarians, Book of papers, 135-143.
- Nocek J. E. (1997): Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.*, 80(5):1005-28.
- Owens F. N., Secrust D. S., Hill W. J., Gill D. R. (1998): Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.*, 76(1):275-286.
- Panousis N., Karatzias H. (1999): Laminitis in dairy cows. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 50(3):206-211.
- Peterse D. J. (1996): Foot laminitis. In Bovine medicine: Diseases and Husbandry of Cattle. Eds. Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R. G. Blackwell science, 353-363.
- Radojičić B., Bojkovski J., Jonić B., Ćutuk R. (2017): Ruminant diseases, II edition. University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine.
- Radojičić B., Bojkovski J., Petrujkić T., Marković R., Šefer D. (2008): Productive diseases in high-yielding dairy cows. *Biotechnology in animal husbandry*, 24:563-575.
- Šamanc H. (2009): Digestive organs diseases in cattle, Naučna knjiga.
- Šamanc H., Adamović M., Vujanac I., Bojkovski J. (2005): The role of rumen acidosis in etiopathogenesis of aseptic pododermatitis in cattle. 4. Symposium "Nutritioun, reproduction and health protection in cattle", 307-313.

Paper received: 27.10.2023.

Paper accepted: 23.11.2023.

DOI 10.7251/VETJSR2301318I

UDK 636.1.09:159.944.4

Оригинални научни рад

PROMJENA FREKVENCE PULSA KONJA KAO INDIKATOR STRESA UZROKOVANOG UTOVAROM U PREVOZNO SREDSTVO

**Predrag ILIĆ¹, Stoja JOTANOVIĆ^{2*}, Slaven GRBIĆ³, Jasmin
KAZAZOVIĆ⁴**

¹Konjički klub “Čokorska polja”, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

²Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, Institut za reprodukciju
domaćih životinja, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

³“SLAVEN” doo Company, Veterinarski zavod, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

⁴Kantonalno javno preduzeće “Veterinarska stanica Sarajevo”, Sarajevo, Bosna i
Hercegovina

*Korespondentni autor: Stoja Jotanović, stoja.jotanovic@agro.unibl.org

Sažetak

Transport i utovar u prevozno sredstvo je potencijalni izvor stresa za konje, što posljedično može dovesti do narušavanja koncepta dobrobiti životinja. Cilj istraživanja bio je da se ispita prisustvo stresne reakcije konja tokom utovara u prevozno sredstvo, iskazane kroz promjenu frekvence pulsa, kao indikator stresne reakcije. Istraživanjem je obuhvaćeno 25 konja, starih između 4 i 20 godina. Verifikacija frekvence rada srca sprovedena je uz upotrebu veterinarskog stetoskopa sa dvostranom membranom i kontrolisana uz pomoć mjerača rada srca. Tokom mirovanja u štali (prvo mjerenje) ustanovljena je frekvencija pulsa između 29 i 40 otkucaja u minuti. Drugo mjerenje izvršeno je u momentu utovara, kada su konji zakoračili na utovarnu rampu prevoznog sredstva, te je ustanovljena frekvencija pulsa između 42 i 72 otkucaja u minuti. Rezultati t-testa ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u frekvenci pulsa između prvog i drugog mjerenja. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da utovar konja u prevozno sredstvo može uzrokovati stres, koji se manifestuje povećanjem frekvence pulsa. Sklonost konja da lako stvaraju navike omogućava njihov trening s ciljem smanjenja nivoa stresa prilikom utovara u prevozno sredstvo, što može doprinijeti poboljšanju dobrobiti konja, a u isto vrijeme smanjiti nivo stresa i rizik od povreda konja i osoblja.

Ključne riječi: konj, utovar, frekvencija pulsa, stres.

UVOD

Razvoj transporta konja kretao se od njihovog kretanja u krdima, putem kola, željezničkog i drumskog saobraćaja, pa sve do upotrebe brodova i aviona (Cregier, 1982). Široka upotreba konja, nekada u ratu, danas u sportu, intenzivnom uzgoju, rekreaciji, konjičkom turizmu, školama jahanja, u zdravstvene svrhe, učešće na sajmovima ili korištenje u industriji mesa imala je za posljedicu povećanje učestalosti transporta konja, koji se transportuju češće u odnosu na druge vrste životinja (Fazio et al., 2013). Za razliku od drugih vrsta životinja, npr. tovnih goveda, svinja ili drugih farmskih životinja, koje se od mjesta gajenja do mjesta iskorištavanja uglavnom prevoze jednokratno, konji, kao radne ili sportske životinje, se tokom njihovog života prevoze često i ponavljano, što može biti izvor stresa, sa različitim posljedicama. Friend (2001) navodi da je transport konja “generalno povezan sa slabijim reproduktivnim rezultatima, povećanom učestalošću bolesti, privremenim ograničenjem atletskih performansi i promjenama u nizu drugih fizioloških osobina koje ukazuju na stres”. Isti autor smatra da je transport povezan sa povećanom učestalošću poremećaja zdravlja, i da stres može imati negativan uticaj na opšte zdravlje konja, uključujući poremećaje u varenju, smanjen imuni odgovor, te promjene u ponašanju. Uopšteno, stres se može definisati kao nespecifičan aktivni odgovor organizma na različite izazove, uzrokovane promijenjenim okolnostima i događajima u okruženju (Borstel et al., 2017).

Imajući u vidu potrebu poštovanja principa dobrobiti konja, kao i u cilju poštovanja strategija za poboljšanje dobrobiti konja tokom njihove upotrebe za rad, za potrebe sporta ili druge vidove upotrebe konja, važno je razumjeti da su konji, kao inteligentne životinje, sposobni da povežu sam transport sa sopstvenim iskustvima tokom utovara, transporta i istovara (Leadon et al., 2008). Jedna od ključnih faza u transportu konja je njihov utovar u prevozno sredstvo, kojim počinje svaki transport, bez obzira na svrhu transporta. Odbijanje konja da uđe u prevozno sredstvo je stresno iskustvo, povezano sa kombinovanim efektima evazivnog ponašanja i neofobične reakcije konja. Utovar konja u prevozno sredstvo, sa tačke gledišta psihologije konja, kombinuje efekte klaustrofobije i neofobije, uključujući tu i društvenu izolaciju, uticaj neprijatnog okruženja i novih jedinki, suženo polje viđenja i ograničeno kretanje, što može uzrokovati anksioznost i visok nivo stresa (Hartmann i sar., 2011). Uz moguće fizičke povrede konja i osoblja koji učestvuju u utovaru u prevozno sredstvo u momentu samog utovara, negativna iskustva koja konj stekne tom prilikom mogu biti značajan ograničavajući faktor u daljem treningu i radu sa konjem, posebno imajući u vidu potrebu za ponavljanjem transporta konja tokom njegovog života (Padalino, 2015). Neofobija, kao strah od novih okolnosti,

kod konja je urođena, i može se manifestovati povećanim nivoom straha tokom svakog sljedećeg utovara u prevozno sredstvo, kao posljedica nepravilnog ili grubog postupka sa konjem. Upotreba fizičkog kažnjavanja, neprijatnog okruženja i otpora konja prilikom utovara, svi zajedno, mogu povećati intenzitet već postojećeg stresnog stanja konja, koje je već nastalo kao rezultat utovara u prevozno sredstvo (Hendriksen i sar., 2011).

McGreevy and McLean (2007) navode da je primjenom odgovarajućeg postupka sa konjem moguće umanjiti stres prilikom utovara u prevozno sredstvo, kao i tokom samog transporta. U svom istraživanju Hendriksen i sar. (2011) ukazuju na postojanje stresa kod konja prilikom utovara, praćenog nepoželjnim ponašanjem konja, koje ukazuje na neprirodnost situacije utovara konja u prevozno sredstvo, zbog sklonosti konja neofobiji i klaustrofobiji. Lee i Doherty (2001) ukazuju na delikatnost procesa utovara, i navode da je 53,4% problema vezanih za transport nastalo u fazi utovara. Uobičajeni izvor stresa za organizam konja je otpor koji konj pruža prilikom utovara u prevozno sredstvo (Shanahan, 2003).

Stresna reakcija na stimulanse iz spoljašnje i unutrašnje sredine organizma manifestuje se serijom promjena u organizmu, od kojih kao inicijalnu reakciju treba izdvojiti izlučivanje kateholamina (adrenalina i noradrenalina), a u kasnijoj fazi i glukokortikosteroida, od kojih treba izdvojiti kortizol, čija povišena koncentracija u organizmu predstavlja indikator stresne reakcije, Iako su promjene koncentracije hormona koji učestvuju u odgovoru organizma na stresogene faktore veoma pouzdan indikator stresne reakcije, njihovo određivanje je vezano za uzorkovanje krvi, kao invazivnu dijagnostičku metodu, koja predstavlja dodatni izvor stresa za jedinku, zbog čega je neophodno uspostaviti alternativnu metodu za procjenu stresne reakcije, koja bi bila neinvazivna, a istovremeno dovoljno pouzdana. Fiziološke promjene u organizmu konja koje nastaju u vezi sa stresom mogu se manifestovati kroz ubrzanje rada srca, odnosno promjene u frekvenci pulsa (Borstel et al., 2017). Povećanje frekvence pulsa tokom utovara konja u prevozno sredstvo u odnosu na fiziološke vrijednosti može ukazivati na aktivaciju simpatičkog nervnog sistema, koji je odgovoran za “bori se ili bježi” reakciju (Yngvesson et al., 2016) i predstavlja jednostavan i pouzdan indikator stresne reakcije konja, koji je moguće ustanoviti neinvazivnim metodama.

Strah konja od utovara u prevozno sredstvo i okolnosti u vezi sa utovarom kao fiziološki stresor može izazvati stres, što dovodi do ubrzanja rada srca (Kay i Hall, 2009). Waran i Cuddeford (1995) navode da je frekvencija rada srca tokom utovara u prevozno sredstvo viša u odnosu na druge vidove fizičkog opterećenja, te zaključuju da je to najstresnija faza transporta. Shanahan (2003) ukazuje da u fazi utovara konja u prevozno sredstvo postoji statistički značajno povećanje frekvence pulsa u

poređenju sa početnim vrijednostima, mjerenim tokom odmora u štali.

Imajući u vidu sve navedeno, cilj istraživanja bio je da se prikažu promjene frekvence pulsa konja, kao indikator intenziteta stresne reakcije konja uzrokovane utovarom u prevozno sredstvo.

MATERIJALI I METODE

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 25 konja, starih od četiri do 20 godina ($\bar{X}=9,04\pm5,623$), iz konjičkih klubova Čokorska polja, Sveti Đorđe i Arion, tokom perioda od novembra 2020. do decembra 2022. godine. Prema starosnoj strukturi ispitane grupe konja, njih 60% bilo je starosti sedam godina i manje, 20% je bilo staro od osam do 15 godina, i 20% je bilo staro 16 i više godina. Od ukupnog broja ispitanih konja, 56% su bili kastrati, 32% kobile i 12% pastuvi. Od ukupne populacije konja obuhvaćenih istraživanjem, 12% bilo je čistokrvne arapske rase, 12% bosansko-hercegovačke brdske rase, 8% holštajn rase, 8% lipicanske rase, 4% KWPN, 4% hanoveranske rase, 32% polukrvnih konja, 8% posavske rase, 4% švedski kasač i 8% konja miješane rase (mješanac lipicanske i arapske rase i mješanac lipicanske i polukrvne rase).

U pogledu upotrebe, 72% konja je korišteno za rekreaciju, a 28% za sportske aktivnosti. Kriterijum za izbor konja uključenih u istraživanje bio je da su lokomotorno pokretni u vrijeme istraživanja i da su bili sposobni da budu vođeni od strane vodiča od startne pozicije do utovarne platforme prevoznog sredstva. Konji uključeni u istraživanje nisu bili utovarani u prevozno sredstvo najmanje tri mjeseca prije dana istraživanja.

Frekvencija pulsa konja u štali (prvo mjerenje, BSFB) mjerena je u mirovanju tokom jednog minuta, nakon čega su konji izvođeni iz štale i vođeni na povocu do polazne linije, sa koje su polazili prema utovarnoj platformi prevoznog sredstva. Polazna linija za utovar bila je smještena 10 metara od utovarne platforme. Na polaznoj liniji konji su držani u mirovanju najmanje tri minuta ili duže, sve dok im se frekvencija pulsa nije izjednačila sa vrijednostima ustanovljenim u mirovanju u štali, sa ciljem da se isključi povećanje frekvencije pulsa zbog kretanja od štale do polazne linije. Drugo mjerenje frekvencije pulsa (BSFU) izvršeno je u momentu kada bi konji zakoračili na utovarnu platformu prevoznog sredstva, u trajanju od jednog minuta. Redoslijed mjerenja frekvencije pulsa u štali i na utovarnoj platformi prevoznog sredstva unutar ispitane grupe konja bio je isti. Verifikacija frekvencije rada srca sprovedena je uz upotrebu veterinarskog stetoskopa sa dvostranom membranom i kontrolisana uz pomoć mjerača rada srca "Polar RS800CX N G3 watch, Polar Electro Oy, Finland". Za sve konje uključene u istraživanje korištena

je isto prevozno sredstvo za dva konja, prikolica “Böckmann Comfort Vollpoly Anhänger für 2 Pferde mit Sattelkammer”.

Opisne karakteristike ispitane grupe konja ustanovljene su uz pomoć metoda deskriptivne statistike, dok je normalnost distribucije rezultata ispitana Kolmogorov-Smirnov testom. Za ispitivanje postojanja statistički značajne razlike u frekvenci pulsa iste grupe konja prilikom mirovanja u štali i prilikom faze utovara u prevozno sredstvo korišten je t-test parnih uzoraka. Povezanost između frekvence pulsa kao indikatora stresne reakcije i utovara u prevozno sredstvo kao potencijalnog izvora stresa ispitana je eta kvadratom. Kao granica statističke značajnosti razlika uzeta je vrijednost od $p < 0.05$. Za statističku obradu podataka korišten je statistički program “SPSS 19”.

REZULTATI

Rezultati ispitivanja frekvencije pulsa prije i tokom utovara u prevozno sredstvo (Tabela 1) ukazuju na višu frekvencu pulsa prilikom utovara u prevozno sredstvo u odnosu na vrijednost ustanovljenu u štali. Frekvencija pulsa mjerena u štali (BSFB) kretala se u rasponu od 29 do 40 otkucaja u minuti, dok se ona mjerena prilikom utovara u prevozno sredstvo (BSFU) kretala u rasponu od 42 do 72 otkucaja u minuti. Normalnost distribucije vrijednosti frekvencija pulsa ispitana je Kolmogorov-Smirnov testom, kojim je ustanovljeno da su rezultati distribucije vrijednosti frekvence pulsa mjenog u štali ($p = 0,147$) potvrdili normalnu distribuciju, dok su rezultati distribucije vrijednosti frekvence pulsa prilikom utovara ($p = 0,004$) pokazali da pretpostavka normalnosti distribucije rezultata nije potvrđena i da je treba odbaciti.

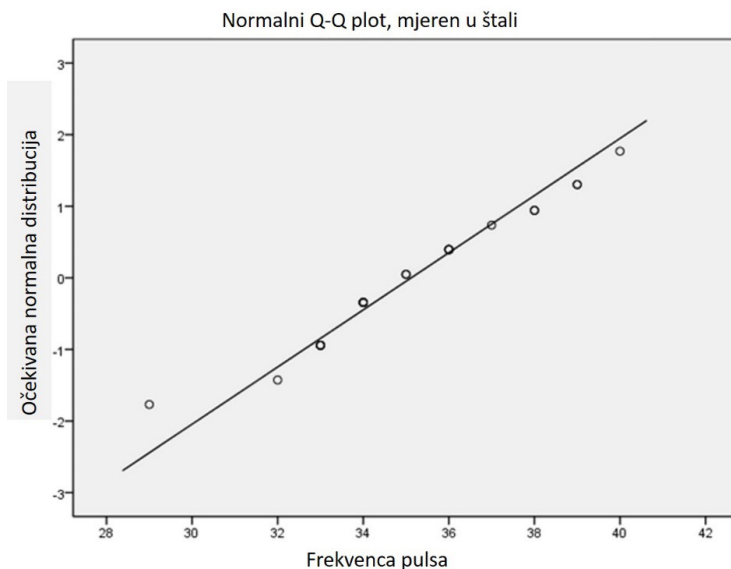
Negativna vrijednost asimetrije frekvence pulsa mjerene u štali (Skew=-0,04) pokazala je da je ona među višim vrijednostima, dok su vrijednosti pljosnatosti (Kurt=0,337) pokazale da su oštrije od normalnih, odnosno da je bilo više rezultata skupljenih oko centra distribucije. Pozitivna vrijednost asimetrije frekvence pulsa mjerene prilikom utovara u prevozno sredstvo (Skew=1,798) ukazuje da su vrijednosti frekvence pulsa bile među nižim vrijednostima, dok vrijednost pljosnatosti (Kurt=6,322) ukazuje da je šiljatija u odnosu na normalne vrijednosti, sa više rezultata grupisanih oko centra distribucije.

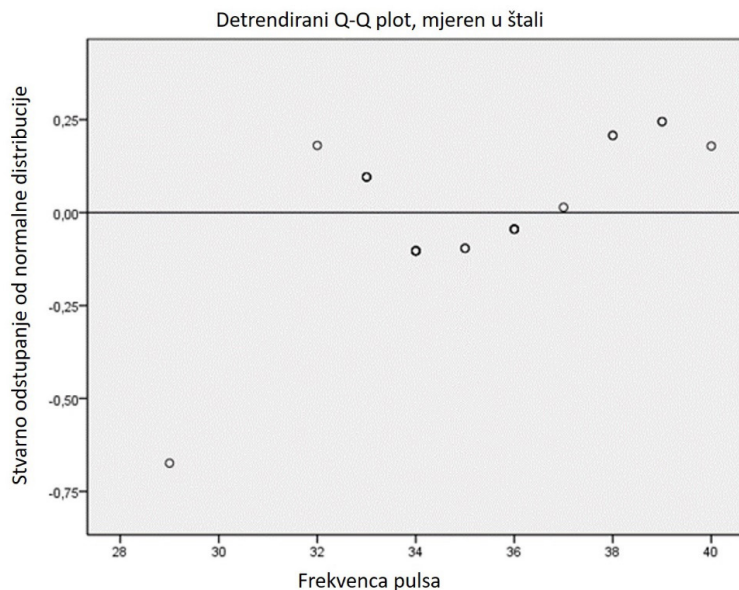
Tabela 1 Deskriptivna statistika za ustanovljene vrijednosti frekvence pulsa

	N	$\bar{X}$	Min	Max	K - S	Sig.	Skew.	Kurt.
BSFB	25	35,12	29	40	0,153	0,147	-0,044	0,337
BSFU	25	52,28	42	72	0,217	0,004	1,798	6,322

Legenda: BSFB – frekvencija pulsa mjerena u štali, BSFU – frekvencija pulsa mjerena prilikom utovara u prevozno sredstvo, N – broj uzoraka, $\bar{X}$ – srednja vrijednost, Min – minimum, Max – maksimum, K – S – Kolmogorov – Smirnov test, Sig – nivo statističke značajnosti ($p < 0.05$), Skew. – vrijednost asimetrije, Kurt. – vrijednost pljosnatosti

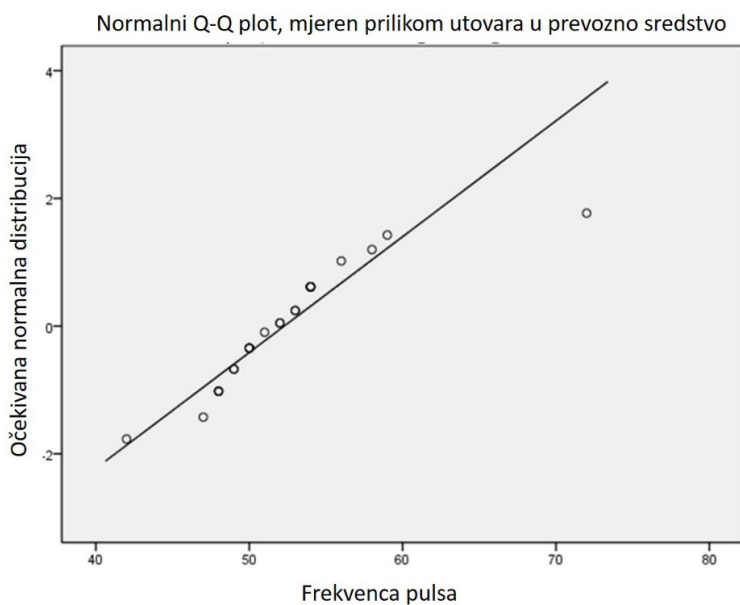
Na normalnost distribucije vrijednosti frekvencije pulsa mjerene u štali (Slika 1) ukazuje i pojava normalne Q-Q plot krivulje, odnosno normalna vjerovatnoća podataka, koji su raspoređeni usko oko prave linije. Detrendirana normalna Q-Q plot krivulja (Slika 2) sa simetrično raspoređenim odstupanjima podataka od horizontalne linije i odsustvo grupisanja podataka ukazuju na normalnost distribucije rezultata.

**Slika 1** Krivulja vjerovatnoće normalne distribucije vrijednosti frekvence pulsa mjerene u štali

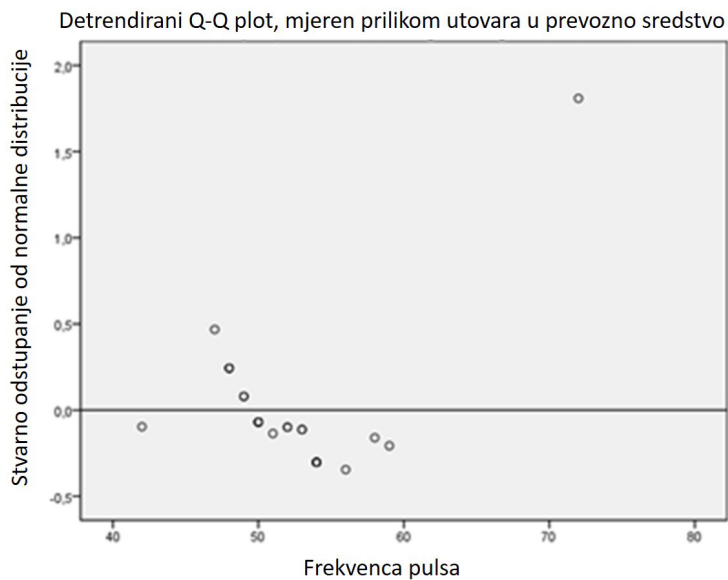


Slika 2 Stvarno odstupanje ustanovljenih vrijednosti frekvence pulsa mjerene u štali

Pojava normalne Q-Q plot krivulje (Slika 3) ukazuje na odstupanje podataka od prave linije kada su u pitanju ustanovljene vrijednosti frekvence pulsa mjerene prilikom utovara konja u prevozno sredstvo. Takođe, asimetrična distribucija i grupisanje podataka u odnosu na horizontalnu liniju prikazanu u detrendiranoj normalnoj Q-Q plot krivulji (Slika 4) pokazuje odstupanje od normalne distribucije.



Slika 3 Krivulja vjerovatnoće normalne distribucije vrijednosti frekvence pulsa mjerene prilikom utovara u prevozno sredstvo



Slika 4 Stvarno odstupanje ustanovljenih vrijednosti frekvence pulsa mjerene prilikom utovara u prevozno sredstvo

Rezultati statistike za uparene uzorke (Tabela 2) ukazuju na povećanje frekvence pulsa izmjerene prilikom utovara u prevozno sredstvo ($\bar{X}=52.28 \pm 5.512$) u odnosu na vrijednosti frekvence pulsa izmjerene u štali ($\bar{X}=35.12 \pm 2.505$).

Tabela 2 Statistika uparenih uzoraka za frekvencu pulsa

	N	($\bar{X}$)	SD	SE
BSFB	25	35,12	2,505	0,501
BSFU	25	52,28	5,512	1,102

Legenda: BSFB – frekvencija pulsa mjerena u štali, BSFU – frekvencija pulsa mjerena prilikom utovara u prevozno sredstvo, N – broj uzoraka, $\bar{X}$ – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, SE – standardna greška aritmetičke sredine,

Uz pomoć T-testa (Tabela 3) ustanovljeno je statistički značajno povećanje frekvence pulsa prilikom utovara konja u prevozno sredstvo u odnosu na vrijednosti frekvence pulsa izmjerene u štali ($t=15.174$; $p<0.00$). Prosječno povećanje frekvence pulsa iznosilo je 17,160, sa intervalom od 95% pouzdanosti u rasponu od 14,826 do 19,494. Rezultat Eta kvadrat testa iznosio je 0,9, i u skladu sa Cohenovim smjernicama, ova vrijednost ukazuje da je utovar konja u prevozno sredstvo imao statistički veoma značajan uticaj na povećanje frekvence pulsa.

Tabela 3 Rezultati T-testa za uparene uzorke

	Uparene razlike					t	df	Sig	Eta kvadrat
	$\bar{X}$	SD	SE	95% interval pouzdanosti					
				donji	gornji				
BSFU - BSFB	17,160	5,654	1,131	14,826	19,494	15,174	24	,000	0,9

Legenda: BSFB – frekvencija pulsa mjerena u štali, BSFU – frekvencija pulsa mjerena prilikom utovara u prevozno sredstvo, $\bar{X}$ – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, SE – standardna greška aritmetičke sredine, t – indikatorska vrijednost, df – stepeni slobode, Sig – nivo statističke značajnosti ($p < 0.05$), Eta kvadrat - Eta kvadrat efekat.

DISKUSIJA

Utovar konja u prevozno sredstvo može značajno uticati na frekvencu pulsa kao indikator reakcije organizma konja na utovar kao stresni događaj. Tokom pripreme za utovar u prevozno sredstvo konji mogu doživjeti stres usljed promjena u okruženju, prisustva nepoznatih predmeta kao što su prevozna sredstva, ili prisustva nepoznatih osoba ili konja, koji mogu biti procijenjeni kao potencijalna prijetnja ili stresogeni faktor. Faza ulaska u prevozno sredstvo često može biti najizazovniji momenat u procesu transporta konja, te stoga i ključni stresogeni faktor (Yngvesson i sar., 2016; Hartmann i sar., 2011). Konji, kao prirodno plašljiva bića, mogu doživjeti utovar u prevozno sredstvo kao potencijalnu opasnost. Tokom ulaska konja u prevozno sredstvo može se uočiti ubrzanje pulsa, kao indikator stresne reakcije na izmijenjene okolnosti (Kay i Hall, 2009). Prevoz konja u prevoznom sredstvu takođe može imati stresni uticaj na konja, jer oscilacije i vibracije do kojih dolazi tokom vožnje mogu biti dodatni izvor stresa za konja. Tokom transporta, posebno ukoliko se on sprovodi na neodgovarajući način (neprimjerena brzina kretanja, nagla skretanja, ubrzavanja i kočenja) konji mogu imati problem sa održavanjem ravnoteže unutar prevoznog sredstva, što može biti dodatni izvor stresa za konja i manifestovati se kroz dodatno ubrzanje pulsa (Tateo i sar., 2012).

Proces istovara konja iz prevoznog sredstva, nakon dolaska na cilj, može predstavljati novi stresni momenat za organizam konja, te novi izvor stresa. Konj treba da prilagodi svoje ponašanje na novu okolinu, a sam akt istovara iz prevoznog sredstva može uzrokovati određeni nivo nelagodnosti, a posljedično i stres. Nakon istovara konja iz prevoznog sredstva, frekvencija pulsa može ostati povišena tokom izvjesnog vremena, jer je konju potrebno vrijeme da se prilagodi na nove okolnosti. Stresna reakcija, iskazana kroz povećanje frekvence pulsa u odnosu na fiziološke vrijednosti, može se održavati i kada konj izađe iz prevoznog sredstva, posebno ukoliko su prethodni utovari, kao i sam transport, imali stresogeni uticaj na organizam konja (Padalino, 2015).

Prilikom upotrebe konja u radu, sportu ili drugim aktivnostima, veoma je važno prepoznati eventualno postojanje stresne reakcije kao indikatora stanja organizma (Mott i sar., 2020). Pored prethodno pomenutih indikatora prisustva i intenziteta stresne reakcije, kao što su nivoi adrenalina i kortizola u krvi, prisustvo stresne reakcije i njen intenzitet je moguće identifikovati preko odstupanja u frekvenciji rada srca, odnosno frekvenciji pulsa (Bukhari i Parkes, 2023; Ohmura i Jones, 2017; Munsters i sar., 2013). Pri tome treba imati na umu da su ključni stresogeni faktori koji utiču na organizam konja prilikom njegove upotrebe u radu, takmičenjima i drugim vidovima upotrebe oni koji potiču iz spoljašnje sredine, i da su oni u

suprotnosti sa prirodnim i uobičajenim oblicima ponašanja konja. Neki od ovih faktora su ograničenje pokreta konja tokom utovara i transporta, novi zvukovi, kontakt sa nepoznatim ljudima, nepoznatim konjima i slični faktori i događaji koji mogu uzrokovati stres (Dlugosz i sar., 2020).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u frekvenci pulsa između mjerenja u štali, tokom odmora, i mjerenja prilikom utovara konja u prevozno sredstvo. Prosječna vrijednost frekvence pulsa bila je značajno viša prilikom utovara u poređenju sa frekvencom pulsa ustanovljenom u štali, a vrijednost eta kvadrata ukazuje da je utovar u prevozno sredstvo imao statistički visoko značajan uticaj na povećanje frekvence pulsa.

Prosječna vrijednost frekvence pulsa mjerene u štali bila je u okvirima očekivanih fizioloških vrijednosti za konje u stanju bez stresa i mirovanju. Vrijednost standardne devijacije ukazuju da su svi konji bili u stanju bez stresa tokom mjerenja frekvence pulsa u štali. Povećanje prosječne vrijednosti frekvence pulsa tokom utovara u prevozno sredstvo ukazuje na prisustvo stresa zbog ispoljavanja straha prilikom utovara, dok vrijednost standardne devijacije ukazuje na individualne razlike u nivou stresa prilikom utovara. Povećanje vrijednosti frekvence pulsa može biti indikator promjena u bihevioralnom stanju konja, odnosno reakcije na nemotorne promjene (Padalino, 2015). Frekvencija pulsa, kao indikator stanja autonomnog nervnog sistema, odnosno neto interakcije između parasimpatičke i simpatičke aktivnosti, može se upotrebiti kao indikator stresne reakcije, odnosno odgovora organizma na datu situaciju. Povećanje frekvence rada srca i frekvence pulsa može se smatrati pouzdanim indikatorom stresne reakcije, kao i njenog intenziteta (Yngvesson i sar., 2016; von Lewinski i sar., 2013), koji je već korišten u istraživanjima sprovedenim na konjima (Borstel i sar., 2017). Schmidt i sar. (2010) takođe navode da je akutni i hronični stres moguće otkriti preko promjena frekvence pulsa i srčanog ritma.

Statistički značajno povećanje frekvence pulsa tokom utovara u poređenju sa vrijednostima u mirovanju, ustanovljeno u ovom istraživanju, u skladu je sa rezultatima do kojih je došao Shanahan (2003), koji ukazuje da postoji značajno povećanje frekvence pulsa tokom faze utovara konja u prevozno sredstvo u poređenju sa početnom pozicijom. Slični rezultati dobijeni su i u istraživanju koje su sproveli Kay i Hall (2009), koji ukazuju sa strah od utovara, kao fiziološki stresor, može uzrokovati stres, koji se manifestuje povećanjem frekvence pulsa. Utovar u prevozno sredstvo je etološki neprirodan događaj za konja i kao takav može biti uzrok straha, te stresa kod konja. Značajno povećanje frekvence rada srca tokom utovara može ukazivati da je utovar u prevozno sredstvo stresna aktivnost, što podržavaju rezultati istraživanja koje su sproveli Waran i Cuddeford (1995), koji su ustanovili da je frekvencija rada srca tokom utovara bila viša nego tokom

samog transporta, te zaključili da je utovar najstresnija faza transporta. Rezultate koji ukazuju da utovar konja u prevozno sredstvo inicira stresnu reakciju podržavaju i rezultati do kojih su došli Tateo i sar. (2012), koji navode da je stres kod konja uvijek prisutan prilikom utovara. Ustanovljeni stres kod konja obuhvaćenih ovim istraživanjem, iskazan kroz statistički značajno povećanje frekvence pulsa tokom utovara, može se takođe objasniti i činjenicom da je (kako potvrđuju i rezultati eta kvadrat testa) utovar konja u prevozno sredstvo imao i statistički značajan uticaj na povećanje frekvence rada srca. Padalino (2015) su svom istraživanju ukazuje da je utovar u prevozno sredstvo „zastrašujuće iskustvo“ za konja, a time i uzrok stresa, dok Dai i sar. (2019) ukazuju da prethodna loša iskustva prilikom utovara mogu dovesti do trajnih promjena u ponašanju konja i povećanja nivoa stresa prilikom utovara u prevozno sredstvo.

Svi konji uključeni u ovo istraživanje imali su prethodna iskustva sa utovarom i transportom. Imajući u vidu da konji imaju sposobnost učenja i formiranja konceptualnog ponašanja u skladu sa svojim razvojnim putem (Murphy i Arkins, 2007), povećanje frekvence rada srca može biti rezultat prethodnih iskustava vezanih za utovar, strah od zatvaranja u ograničeni prostor ili očekivanje transporta. Reakcije otpora konja prilikom utovara u prevozno sredstvo mogu imati za posljedicu povređivanje konja i osoblja. Skraćen period treninga, nepravilna upotreba opreme i neodgovarajući pristup individualnosti svakog konja može dovesti do neželjenih reakcija konja (Hendriksen i sar., 2011), te povreda konja i osoblja koje radi sa njima. Pravilne metode treninga konja mogu dovesti do stvaranja dugoročnih poželjnih promjena u ponašanju konja, sa ciljem smanjenja reaktivnog ponašanja (Dai i sar., 2019). Neaversionne metode navikavanja i treninga konja za utovar mogu smanjiti nivo stresa i rizika povezanih sa utovarom konja u prevozno sredstvo (Padalino i Riley, 2020; Yngvesson i sar., 2016; Shanahan, 2003), Pozitivna indukcija kroz nagrađivanje konja i druge vrste pozitivnih iskustava kao metoda treninga konja može dati ohrabrujuće rezultate u obuci konja za utovar u prevozna sredstva i smanjenju nivoa stresa (Dai i sar. 2019; McGreevy i McLean, 2007). Bukhari i sar. (2021) takođe ukazuju na važnost pozitivne indukcije konja za smanjenje nivoa stresa, kao i da je važno uspostaviti odgovarajuće metode rada sa konjima sa ciljem zaštite njihove dobrobiti.

ZAKLJUČAK

Promjene u frekvenci pulsa konja mogu se koristiti kao indikator stresne reakcije uzrokovane utovarom u prevozno sredstvo. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je kod konja postojala stresna reakcija prilikom utovara u prevozno sredstvo, na šta ukazuje statistički značajno povećanje frekvence pulsa tokom utovara u odnosu na vrijednosti ustanovljene prilikom mirovanja u štali. Prilikom tumačenja rezultata ovog i sličnih istraživanja, pored samo uticaja utovara konja, neophodno je uzeti u obzir i druge faktore koji mogu uticati na intenzitet stresne reakcije konja na manipulaciju, kao što su psihosocijalni aspekti njihovog odrastanja, metode prethodnog rada sa njima, njihova prethodna iskustva u manipulaciji prilikom prethodnih utovara, rasne i individualne osobine svakog konja.

Razumijevanje uzroka stresne reakcije konja na utovar u prevozno sredstvo je važan element u kreiranju mjera za prilagođavanje procesa utovara potrebama dobrobiti konja, te smanjenje intenziteta njihove stresne reakcije. Literaturni podaci ukazuju na povoljan uticaj pozitivne indukcije konja uz pomoć nagrađivanja ili drugih vidova pozitivnih iskustava na smanjenju intenziteta stresne reakcije na različite vidove manipulacije sa konjima, uključujući i utovar u prevozno sredstvo, zbog čega je u narednom periodu neophodno sprovesti dalja istraživanja, sa ciljem uspostavljanja optimalnog modela postupanja sa konjima prilikom utovara u prevozno sredstvo.

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

LITERATURA

- Borstel U. K. V., Visser E. K., Hall C. (2017): Indicators of stress in equitation. *Applied Animal Behaviour Science*, 190:43-56.
- Bukhari S. S., McElligott A. G., Parkes R. S. (2021): Quantifying the impact of mounted load carrying on equids: a review. *Animals*, 11(5):1333.
- Bukhari S. S., Parkes R. S. (2023): Assessing the impact of draught load pulling on welfare in equids. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.
- Cregier S. E. (1982): Reducing equine hauling stress: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2(6):186-198.
- Dai F., Dall Costa A., Bonfanti L. (2019): Positive reinforcement based training for self loading of meat horses reduces loading time and stress related behavior. *Front Vet Sci*, 6:350.
- Dlugosz B., Prochniak T., Stefaniuk-Szmukier M., Basiaga M., Luszczyński J., Pieszka M. (2020): Assessment of changes in the saliva cortisol level of
-

- horses during different ways in recreational exploitation. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(4):754-762.
- Fazio E., Medica P., Cravana C., Ferlazzo A. (2013): Cortisol response to road transport stress in calm and nervous stallions. *Journal of Veterinary Behavior*, 8(4):231-237.
- Friend T. H. (2001): A review of recent research on the transportation of horses. *Journal of Animal Science*, 79(suppl_E):E32-E40.
- Hartmann E., Christensen J. W., Keeling L. J. (2011). Training young horses to social separation: Effect of a companion horse on training efficiency. *Equine Veterinary Journal*, 43(5):580-584.
- Hendriksen P., Elmgreen K., Ladewig J. (2011): Trailer-loading of horses: Is there a difference between positive and negative reinforcement concerning effectiveness and stress-related signs? *Journal of Veterinary Behavior*, 6(5):261-266.
- Kay R., Hall C. (2009): The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2-4):237-243.
- Leadon D., Waran N., Herholz C., Klay M. (2008): Veterinary management of horse transport. *Vet Ital*, 44(1):149-163.
- Lee J., Houpt K. A., Doherty O. (2001): A survey of trailering problems in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 21(5):235-238.
- McGreevy P. D., McLean A. N. (2007): Roles of learning theory and ethology in equitation. *Journal of Veterinary Behavior*, 2(4):108-118.
- Mott R. O., Hawthorne S. J., McBride S. D. (2020): Blink rate as a measure of stress and attention in the domestic horse (*Equus caballus*). *Scientific reports*, 10(1):21409.
- Munsters C. C., de Gooijer J. W., van den Broek J., van Oldruitenborgh-Oosterbaan M. S. (2013): Heart rate, heart rate variability and behaviour of horses during air transport. *Veterinary Record*, 172(1):15.
- Murphy J., Arkins S. (2007): Equine learning behaviour. *Behavioural Processes*, 76(1):1-13.
- Ohmura H., Jones J. H. (2017): Changes in heart rate and heart rate variability as a function of age in Thoroughbred horses. *Journal of Equine Science*, 28(3):99-103.
- Padalino B. (2015): Effects of the different transport phases on equine health status, behavior, and welfare: A review. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(3):272-282.
- Padalino B., Riley C. B. (2020): The implications of transport practices for horse health and welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:202.
-

- Schmidt A., Biau S., Möstl E., Becker-Birck M., Morillon B., Aurich J., Faure J. M., Aurich C. (2010): Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(3):179-189.
- Shanahan S. (2003): Trailer loading stress in horses: behavioral and physiological effects of nonaversive training (TTEAM). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 6(4):263-274.
- Tateo A., Padalino B., Boccaccio M., Maggiolino A., Centoducati P. (2012): Transport stress in horses: Effects of two different distances. *Journal of Veterinary Behavior*, 7(1):33-42.
- von Lewinski M., Biau S., Erber R., Ille N., Aurich J., Faure J. M., Möstl E., Aurich C. (2013): Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: Different responses to training and performance. *The Veterinary Journal*, 197(2):229-232.
- Waran N. K., Cuddeford D. (1995): Effects of loading and transport on the heart rate and behaviour of horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 43(2):71-81.
- Yngvesson J., de Boussard E., Larsson M., Lundberg A. (2016): Loading horses (*Equus caballus*) onto trailers—Behaviour of horses and horse owners during loading and habituating. *Applied Animal Behaviour Science*, 184:59-65.

Рад примљен: 01.12.2023.

Рад прихваћен: 11.12.2023.

DOI 10.7251/VETJEN2301333I

UDK 636.1.09:159.944.4

Oroiginal Scientific Paper

CHANGE OF PULSE FREQUENCY IN HORSES AS AN INDICATOR OF STRESS CAUSED BY LOADING INTO THE TRAILER

Predrag ILIĆ¹, Stoja JOTANOVIĆ^{2*}, Slaven GRBIĆ³, Jasmin KAZAZOVIĆ⁴

¹Equestrian Club “Čokorska Polja”, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

²University of Banja Luka, Faculty of Agriculture, Institute for Reproduction of Domestic Animals, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

³SLAVEN doo Company, Veterinary Institute, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁴Cantonal Public Organisation “Veterinary Station Sarajevo”, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: Stoja Jotanović, stoja.jotanovic@agro.unibl.org

Summary

Transport and loading into a trailer is a potential source of stress for horses, which can consequently undermine the concept of animal welfare. The study aimed to determine the presence of stress reaction in horses during the loading into the trailer, expressed through a change in pulse frequency as an indicator of stress reaction. The study included 25 horses between the ages of 4 and 20. Heart rate verification was performed using a veterinary stethoscope with a double-sided membrane and controlled by a heart rate monitor. When the horses were resting in the stable (first measurement), a pulse frequency of 29 to 40 bpm was found. The second measurement was performed at the moment of loading when the horses stepped onto the loading platform of the trailer, and pulse frequency values from 42 to 72 bpm were found. The results of the t-test indicate that there is a statistically significant difference in the pulse frequency between the first and second measurements. The results of this study indicate that loading horses into the trailer can cause stress, which is manifested by an increase in pulse frequency. The tendency of horses to easily form habits allows their proper training to reduce the level of stress while loading into trailers, which would contribute to improving the well-being of horses, and at the same time contribute to reducing stress and the risk of injury to horses and staff.

Key words: horse, loading, pulse frequency, stress.

INTRODUCTION

The evolution of horse transport ranged from their movement in herds, by carts, through rail and road traffic, all the way to the use of ships and aeroplanes (Cregier, 1982). The diverse use of horses, once in war, today in sports, intensive breeding, recreation, equestrian tourism, riding schools, use in healthcare, participation in fairs and the meat industry increased the frequency of transporting horses, which are transported more often than other types of animals (Fazio et al., 2013). Unlike other types of animals, for example, beef cattle, pigs or other farm animals, which are transported from the place of breeding to the place of use mostly once, horses, as working or sport animals, are transported often and repeatedly during their life, which can be a source of stress, with various consequences. Friend (2001) states that horse transport is “generally associated with lower reproductive rates, increased incidence of disease, temporary reduction in athletic performance and changes in many other physiological traits indicative of stress”. The same author states that transportation is associated with an increased frequency of health disorders and that stress can have negative effects on the general health of horses, including digestive disturbances, reduced immune response, and behavioural changes. In general, stress can be defined as a non-specific active response of the organism to various challenges, caused by changed conditions and events in the environment (Borstel et al., 2017). Considering the need to respect the principles of horse welfare, as well as to respect strategies for improving the welfare of horses during their use in work, for sports or for other types of horse use, it is important to understand that horses, as intelligent animals, are capable of connecting transport itself with their experiences during loading, transport and unloading (Leadon et al., 2008).

One of the key stages of transporting horses is their loading into the trailer, with which every transport begins, regardless of the purpose of the transport. The horse's refusal to enter the trailer is a stressful experience accompanied by the combined effects of evasive behaviour and neophobic reactions of the horse. Horse loading into the trailer, from the point of view of horse psychology, combines the effects of claustrophobia with neophobia, including social isolation, effects of unfamiliar surroundings and new individuals, narrowed field of vision, and limited movement, which can cause anxiety and a high level of stress (Hartmann et al., 2011). In addition to possible physical injuries of the horse and the persons participating in the loading into the trailer at a given moment, the negative experiences that a horse acquires on that occasion can be a significant limiting factor in further training and work with a horse, especially bearing in mind the need for repeated transportation of horse during its life (Padalino, 2015). Neophobia, as the fear of

new circumstances, is innate in horses and can be manifested by an increase in fear during each subsequent loading into the trailer, due to inappropriate or rough handling of the horse. The use of physical punishment, inappropriate environment and resistance of the horse during loading, altogether can increase the already existing stress state of the horse, which already arises as a result of loading into the trailer (Hendriksen et al., 2011). McGreevy and McLean (2007) report that by applying appropriate methods of horse handling, the stress that occurs when loading into the trailer, as well as during transport itself, can be reduced. In their research, Hendriksen et al. (2011) point to the presence of stress in horses during loading, followed by undesirable behaviour, highlighting the unnaturalness of the situation of loading into a trailer, due to neophobia and claustrophobia to which horses are prone. Lee et al. (2001) point to the delicacy of the loading process, finding that 53.4% of transport-related problems are initiated at the loading stage. A common source of stress for the horse's body is precisely the resistance that horses offer when being loaded into a trailer (Shanahan, 2003).

The stress reaction to stimuli from the external and internal environment of the organism is manifested by a series of changes in the organism, of which the secretion of catecholamines (adrenaline and noradrenaline) should be singled out as an initial reaction, and in a later phase the secretion of glucocorticosteroids, of which cortisol should be singled out, whose increased concentration in the body is an indicator of the stress reaction. Although changes in hormone concentrations that participate in the body's response to stressful factors are a very reliable indicator of a stress reaction, their determination is related to blood sampling, an invasive diagnostic method, which represents an additional source of stress for the individual, which is why it is necessary to establish an alternative method for assessing the intensity stress reactions, which would be non-invasive and at the same time sufficiently reliable. Physiological changes in the horse's organism related to stress can be manifested through an acceleration of the heart rate, i.e. a change in the pulse frequency (Borstel et al., 2017). An increase in pulse frequency when loading a horse into a trailer, compared to physiological values, may indicate the activation of the sympathetic nervous system, which is responsible for the "fight or fly" response (Yngvesson et al., 2016) and is a simple and reliable indicator of the horse's stress reaction, which can be monitored by non-invasive methods. The horse's fear of being loaded into a trailer and circumstances related to loading, as a psychological stressor, can cause stress, which increases the heart rate (Kay and Hall, 2009). Waran and Cuddeford (1995) report that heart rate during loading into a transport vehicle is higher than during various types of physical exertion, concluding that this is the most stressful phase of transport. Shanahan (2003) indicates that in the phase

of horse loading into the trailer, there was a significant increase in pulse frequency compared to the initial values, measured at rest or in the stable.

Bearing in mind all of the abovementioned, study aimed to show the changes in the horse's pulse frequency, as an indicator of the intensity of the stress reaction caused by loading into a trailer.

MATERIALS AND METHODS

The study included a total of 25 horses aged from 4 to 20 years ($\bar{X}=9,04\pm5,623$), from the equestrian clubs Čokorska polja, St. Đorđe and Arion, during the period from November 2020 to December 2022. According to the age structure of the examined group of horses, 60% were seven years old and under, 20% were from eight to 15 years old and 20% were 16 years old and older. Of the total number of horses examined, 56% were geldings, 32% mares and 12% stallions. Of the entire population of horses included in study, 12% were purebred Arabian horses, 12% Bosnian-Herzegovinian mountain horses, 8% Holstein horses, 8% Lipizzaner horses, 4% KWPN, 4% Hanoverian horse, 32% half-breed horses, 8% Posavac, 4% Swedish trotter, and 8% of horses are mixed breed, namely Lipizzaner x Arabian horse and Lipizzaner x half-breed horse. According to use, 72% of horses were used for recreation and 28% for sports. The criterion for the selection of horses included in the study was that they were all locomotory sound at the time of examination and that they were able to be led by their handler from the resting position to the loading ramp of the trailer. The horses included in the research were not loaded into the trailers at least three months before the day of the examination.

The horses' pulse frequency in the stable (the first measurement, BSFB) was measured at rest for one minute, after which they were brought from the stable while walking on a halter and on a lead to the line from which they headed towards the loading platform of the trailer. The starting loading line was located 10 meters from the loading platform. At the starting line, the horses were kept at rest for a minimum of three minutes or longer, until the pulse frequency equalled the value at rest in the stable, intending to eliminate the increase in pulse due to the effect of the horse's movement from the stable to the starting line. The second pulse frequency measurement was performed from the moment of stepping on the loading platform of the trailer (BSFU) for one minute. The order of pulse frequency measurement in the stable and on the loading platform within the examined group of horses was in the same order. Heart rate verification was performed using a veterinary stethoscope with a double-sided membrane and controlled by a heart rate monitor "Polar RS800CX N G3 watch, Polar Electro Oy, Finland". For all the horses

included in the study, the same car trailer for two horses, “Böckmann Comfort Vollpoly Anhänger für 2 Pferde mit Sattelkammer” brand was used.

Descriptive characteristics of the examined group of horses were obtained using the methods of descriptive statistics, while the normality of the distribution of the results was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The t-test of paired samples was used to examine whether there was a statistically significant difference in pulse frequency in the same group of horses at rest in the stable and in the phase of loading into the trailer. The relationship between pulse frequency as an indicator of stress reaction and loading into a trailer as a potential source of stress was investigated by eta square. A value of $p < 0.05$ was taken as the limit of statistical significance of differences. The statistical program “SPSS 19” was used for data processing.

RESULTS

The results of the pulse frequency before and during loading into the trailer (Table 1) indicate a higher pulse frequency when loading to the trailer, compared to the pulse frequency measured in the stable. The pulse frequency measured in the stable (BSFB) was in the range from 29 bpm to 40 bpm, and the one measured during loading into the trailer (BSFU) from 42 bpm to 72 bpm. The normality of the distribution of pulse frequency values was tested by the Kolmogorov-Smirnov test, where the results of the distribution of pulse frequency values in stable ($p=0.147$) confirm the normal distribution, while the results of the distribution of pulse frequency values during loading ($p=0.004$) showed that the assumption of normality of the distribution of results is not confirmed and should be rejected.

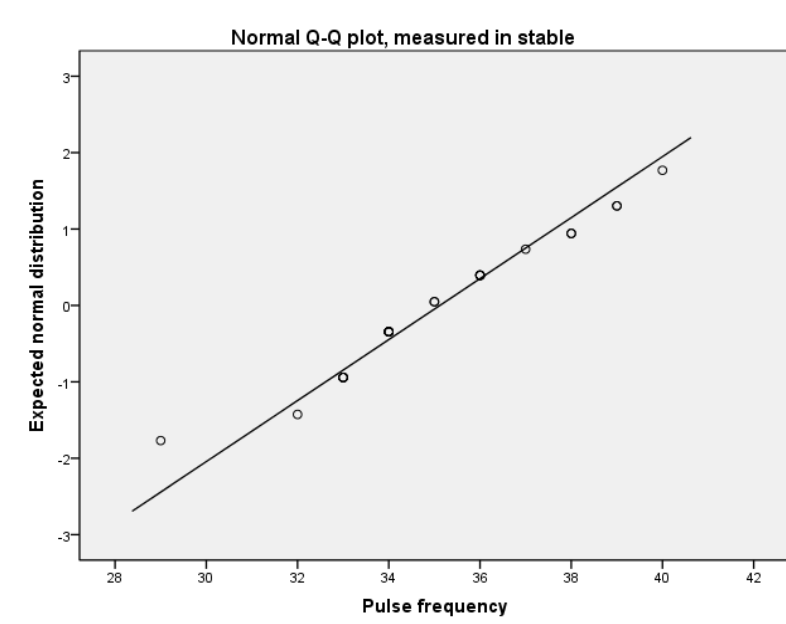
The negative value of the asymmetry of the pulse frequency measured in stable (Skew=-0.04) showed that it was among the higher values, while the flattening values (Kurt=0.337) showed that it was sharper than normal, i.e. that there were more results clustered around the centre of the distribution. The positive value of pulse asymmetry during horse loading into the trailer (Skew=1.798) reveals that the values of the pulse frequency were among the lower values, while the flattening value (Kurt=6.322) indicates that it was more pointed than normal with more results grouped around the distribution centre.

Table 1 Descriptive statistic for obtained pulse frequency values

	N	$\bar{X}$	Min	Max	K - S	Sig.	Skew.	Kurt.
BSFB	25	35,12	29	40	0,153	0,147	-0,044	0,337
BSFU	25	52,28	42	72	0,217	0,004	1,798	6,322

Legend: BSFB – pulse frequency measured in the stable, BSFU – pulse frequency measured during loading, N – number of samples, $\bar{X}$ - mean value, Min – minimum, Max – maximum, K – S – Kolmogorov – Smirnov test, Sig. – significance level ($p < 0.05$), Skew. – the value of asymmetry, Kurt. - flattening value.

The normality of the distribution of pulse frequency values measured in stable (Figure 1) is also indicated by the appearance of the Normal Q - Q Plot curve, i.e. the normal probability of the data, which are closely distributed along a straight line. The Detrended Normal Q – Q Plot curve (Figure 2) with symmetrically distributed deviations of data from the horizontal line and the absence of data grouping indicates the normality of the distribution of results.

**Figure 1** Curve of the normal probability distribution of the pulse frequency values measured in the stable

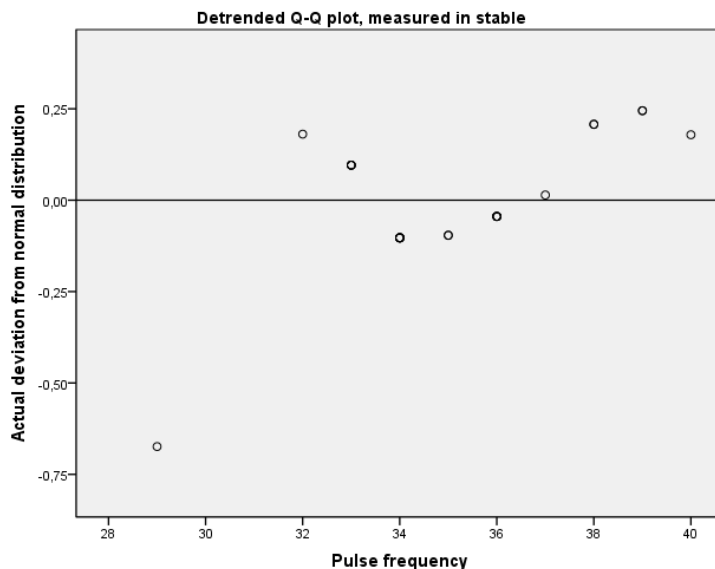


Figure 2 Actual deviation of the observed pulse frequency values measured in the stable

The appearance of the Normal Q – Q Plot curve (Figure 3) shows the deviation of data from the straight line for the established pulse frequency values obtained by measurement during horse loading into the trailer. Also, the asymmetric distribution and grouping of the data in relation to the horizontal line shown in the Detrended Normal Q – Q Plot (Figure 4) show a deviation from the normal distribution.

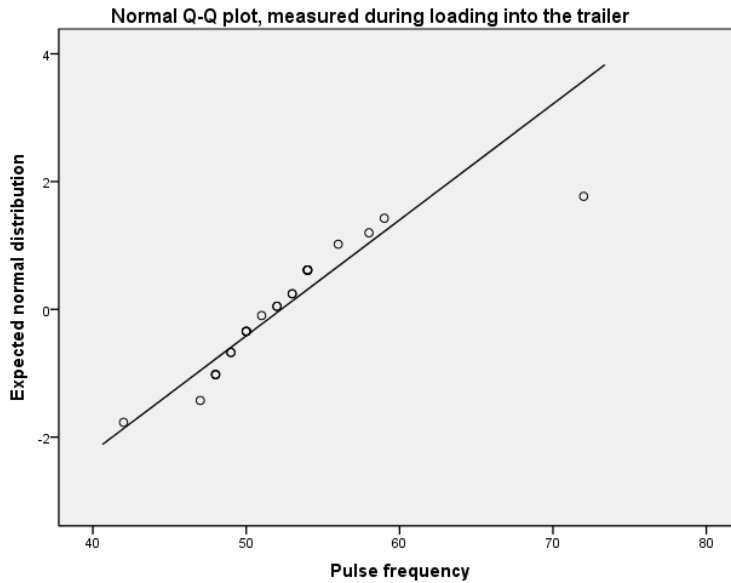


Figure 3 Curve of the normal probability distribution of pulse frequency values measured during loading into the trailer

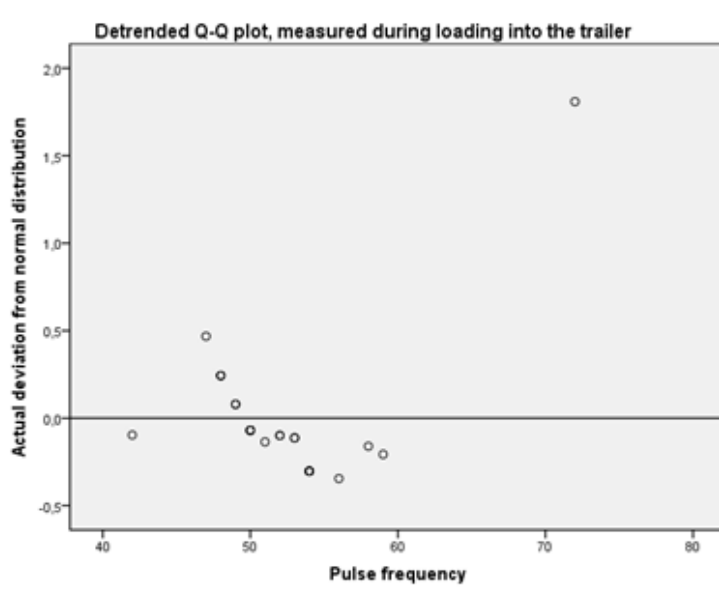


Figure 4 Actual deviation of observed pulse frequency results measured during loading into the trailer

The results of the statistics for the paired samples (Table 2) indicate an increase in the pulse frequency measured during loading into the trailer ($\bar{X}=52.28\pm5.512$) in relation to the values of the pulse frequency measured in the stable ($\bar{X}=35.12\pm2.505$).

Table 2 Paired sample statistics for pulse frequency

	N	($\bar{X}$)	SD	SE
BSFB	25	35,12	2,505	0,501
BSFU	25	52,28	5,512	1,102

Legend: BSFB – pulse frequency measured in the stable, BSFU –pulse frequency measured during loading, N – number of samples, $\bar{X}$ – mean value, SD – standard deviation, SE – standard error.

By using the T-test (Table 3), a statistically significant increase in the value of the pulse frequency was found when loading the horse into the trailer to the value of the pulse frequency measured in the stable [$t=15.174$; $p<0.00$]. The average increase in pulse frequency was 17,160, while the 95-percent confidence interval extends from the lower 14,826 to the upper 19,494. The result of the Eta square was 0.9, and following Cohen’s guidelines, this value indicates that loading a horse into a trailer has a statistically very significant effect on increasing the pulse frequency.

Table 3 Results of T-test for paired samples

	Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)	Eta square
	$\bar{X}$	SD	SE	95 % Confidence Interval of the Differences					
				Lower	Upper				
BSFU - BSFB	17,160	5,654	1,131	14,826	19,494	15,174	24	,000	0,9

Legend: BSFB – number of pulse frequency measured in the stable, BSFU – number of pulse frequency measured during loading, Mean ($\bar{X}$) – mean increase in pulse, SD – standard deviation, t – indicator value, df – degree of freedom, (2-tailed) - level of significance ($p < 0.05$), Eta square - Eta square effect size.

DISCUSSION

Loading a horse into a trailer can significantly affect pulse frequency as an indicator of the horse's organism's response to loading as a stressful event. During the preparation for loading into the trailer, horses may experience stress due to changes in the environment, the presence of unknown objects such as trailers, or the presence of unknown persons and other horses that can be perceived as a potential threat and stressogenic factor. The stage of entering into the trailer can often be the most challenging moment within the process of horse transport, and thus a key stressogenic factor (Yngvesson et al., 2016, Hartmann et al., 2011). Horses, which are naturally timid beings, can perceive entering a trailer as a potential danger. During the entry of the horse into the trailer, an acceleration of the pulse frequency can be observed, as an indicator of stress reaction to the changed circumstances (Kay and Hall, 2009). Driving a horse in a trailer can also have a stressful effect on the horse because the oscillations and vibrations that occur during the ride can cause additional stress in the horse. During transport, especially if it is carried out in an inappropriate manner (inappropriate speed, sudden turns, acceleration and deceleration), horses can have difficulties with maintaining balance inside the trailer, which can be an additional source of stress, and manifest itself in an increase in pulse frequency (Tateo et al., 2012).

The process of unloading the horse from the trailer, after arriving at the destination, can represent another stressful moment for the horse's organism, and a new source of stress. The horse needs to adapt its behaviour to the new environment, and the very act of unloading from the trailer can cause a certain amount of discomfort and, consequently, stress. After unloading the horse from the trailer, the pulse frequency may remain increased for some time, because the horse needs some time to adapt to the new conditions. The stress reaction, expressed through an increase in pulse frequency compared to physiological values, can be maintained even after the horse has left the trailer, especially if the previous loading process, as well as the transport itself, had a stressful effect on the horse's body (Padalino, 2015).

When using horses in work, sports and other activities, it is of great importance to recognize the possible presence of a stress reaction as an indicator of the state of the organism (Mott et al., 2020). In addition to the previously mentioned indicators of the presence and intensity of a stress reaction, such as the level of adrenaline and cortisol in the blood, the presence of a stress reaction and its intensity can be identified through the variability of the heart rate, i.e. the pulse rate (Bukhari and Parkes, 2023; Ohmura and Jones, 2017, Munsters et al., 2013). It should be borne in mind that the key stressogenic factors that affect the horse's organism during its

use in work, competitions and other types of use are those that originate from the external environment, and are in contrast to the natural and usual forms of horse behaviour. Some of these factors are the restriction of the horse's movement during loading and transport, new sounds, contact with unknown people, unknown horses and similar factors and events that can cause stress (Dlugosz et al., 2020).

The results of this study showed that there was a statistically significant difference in the pulse frequency between the measurement in the stable during rest and the measurement when loading the horse into the trailer. The mean value of the pulse frequency was significantly higher during loading compared to the pulse frequency in the stable, and the value of eta square indicates that loading into the trailer has a statistically very significant effect on the increase in pulse frequency.

The mean value of the pulse frequency measured in the stable was in the range of expected physiological values for horses without stress and at rest. The value of the standard deviation indicates that all horses were not under stress during the measurement of the pulse frequency in the stable. An increase in the mean value of the pulse frequency during loading into the trailer indicates the presence of stress in horses due to fear during loading, while the value of the standard deviation indicates individual differences in the level of stress reaction during loading. An increase in the value of the pulse frequency can be an indicator of a change in the horse's behavioural state, i.e. a reaction to non-motor changes (Padalino, 2015). Pulse frequency as an indicator of the state of the autonomic nervous system, i.e. the net interaction between parasympathetic and sympathetic activity, can be used as an indicator of stress reaction, ie. the organism's response to a given situation. An increase in heart rate and pulse frequency can be considered a reliable indicator of stress reaction, as well as its intensity (Yngvesson et al., 2016, von Lewinski et al., 2013) and was previously used in studies conducted on horses (Borstel et al., 2017). Schmidt et al. (2010) also claim that acute and chronic stress can be identified through an increase in pulse frequency and a change in heart rhythm.

A statistically significant increase in the pulse frequency during loading compared to the measurement at rest, found in our study, is following the results of Shanahan (2003), who points out that there was a significant increase in the pulse frequency in the phase of loading the horse into the trailer compared to the starting position. Similar results were obtained in the study of Kay and Hall (2009), who state that the fear of loading, as a psychological stressor, can cause stress, which is indicated by an increase in pulse frequency. Loading into a trailer is ethologically unnatural for a horse and as such can be a cause of fear and therefore stress in the horse. A significant increase in heart rate during loading may indicate that loading into a trailer is a stressful activity, which is supported by the study of Waran and

Cuddeford (1995), who found that the heart rate during loading was higher than during transport itself, and concluded that loading is the most stressful phase of transport. The results indicating that loading a horse into a trailer initiates a stressful state are also supported by Tateo et al., (2012), who claim that stress is always identified in horses during loading. The detected stress in the horses included in our study expressed through a significant increase in pulse frequency during loading, can also be explained by the fact that loading has a very large effect (indicated by eta square value) on the increase in heart rate. Padalino (2015) in his study indicates that loading is a “frightening experience” for the horse, and a source of stress, while Dai et al. (2019) indicate that previous negative loading experiences can lead to permanent changes in the horse’s behaviour and increase stress level during loading into trailer.

All horses included in the study had previous experience of loading and transport. Considering that the horse can learn and form conceptual behavior following its evolutionary course (Murphy and Arkins, 2007), the increase in heart rate may be the result of previous experiences related to loading, fear of confinement in a confined space or anticipation of transport. Conflicting reactions of the horse during loading into the trailer can lead to injuries to the horse and man. Condensed training period, inappropriate use of aids and inadequate approach to the individuality of each horse can produce unwanted responses in the horse (Hendriksen et al., 2011), and thus injury to the horse and the people who work with them. The correct training method can produce long-term desirable behavioural changes in horses to reduce reactive behaviour (Dai et al., 2019). Non-aversive methods of habituation and horse training to be loaded can reduce the level of stress and risks associated with loading a horse into a trailer (Padalino and Riley, 2020; Yngvesson et al., 2016; Shanahan, 2003). Positive induction through rewards and other types of positive experiences as a method of horse training can give encouraging results in training horses to be loaded in trailers and reducing stress levels (Dai et al.; 2019, McGreevy and McLean, 2007). Bukhari et al. (2021) also point to the importance of positive horse induction for reducing stress levels, and that it is important to establish proper horse management methods to protect their well-being.

CONCLUSION

Changes in the pulse frequency in horses can be used as an indicator of the stress reaction caused by loading into a trailer. The results of this study indicate that the horses had a stressful reaction when being loaded into the trailer, indicated by a statistically significant increase in pulse frequency during loading, compared to the

values found when resting in the stable. When interpreting the results of this and similar studies, in addition to the effect of the horse loading procedure, it is necessary to take into account other factors that can affect the intensity of the horse's stress reaction to manipulation in general, such as the psychosocial aspects of their growing up, the methods of the previous of working with them, their previous experiences in manipulation during previous loading, breed and individual characteristics of each horse. Understanding the causes of a horse's stress reaction to being loaded into a trailer is an important element in the creation of measures that will adapt the loading process to the needs of the horse's well-being, and to reduce the intensity of their stress reaction. Literature data indicate the beneficial effect of positive induction of horses with the help of rewards or other types of positive experiences on reducing the intensity of the stress reaction during various types of manipulation with horses, including when loading them into a trailer, which is why it is necessary to conduct wider research in future, to establish an optimal model of dealing with horses when loading them into the trailer.

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

REFERENCES

- Borstel U. K. V., Visser E. K., Hall C. (2017): Indicators of stress in equitation. *Applied Animal Behaviour Science*, 190:43-56.
- Bukhari S. S., McElligott A. G., Parkes R. S. (2021): Quantifying the impact of mounted load carrying on equids: a review. *Animals*, 11(5):1333.
- Bukhari S. S., Parkes R. S. (2023): Assessing the impact of draught load pulling on welfare in equids. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.
- Cregier S. E. (1982): Reducing equine hauling stress: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2(6):186-198.
- Dai F., Dall Costa A., Bonfanti L. (2019): Positive reinforcement based training for self loading of meat horses reduces loading time and stress related behavior. *Front Vet Sci*, 6:350.
- Dlugosz B., Prochniak T., Stefaniuk-Szmukier M., Basiaga M., Luszczynski J., Pieszka M. (2020): Assessment of changes in the saliva cortisol level of horses during different ways in recreational exploitation. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(4):754-762.
- Fazio E., Medica P., Cravana C., Ferlazzo A. (2013): Cortisol response to road transport stress in calm and nervous stallions. *Journal of Veterinary Behavior*, 8(4):231-237.
-

- Friend T. H. (2001): A review of recent research on the transportation of horses. *Journal of Animal Science*, 79(suppl_E):E32-E40.
- Hartmann E., Christensen J. W., Keeling L. J. (2011). Training young horses to social separation: Effect of a companion horse on training efficiency. *Equine Veterinary Journal*, 43(5):580-584.
- Hendriksen P., Elmgreen K., Ladewig J. (2011): Trailer-loading of horses: Is there a difference between positive and negative reinforcement concerning effectiveness and stress-related signs? *Journal of Veterinary Behavior*, 6(5):261-266.
- Kay R., Hall C. (2009): The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2-4):237-243.
- Leadon D., Waran N., Herholz C., Klay M. (2008): Veterinary management of horse transport. *Vet Ital*, 44(1):149-163.
- Lee J., Houpt K. A., Doherty O. (2001): A survey of trailering problems in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 21(5):235-238.
- McGreevy P. D., McLean A. N. (2007): Roles of learning theory and ethology in equitation. *Journal of Veterinary Behavior*, 2(4):108-118.
- Mott R. O., Hawthorne S. J., McBride S. D. (2020): Blink rate as a measure of stress and attention in the domestic horse (*Equus caballus*). *Scientific reports*, 10(1):21409.
- Munsters C. C., de Gooijer J. W., van den Broek J., van Oldruitenborgh-Oosterbaan M. S. (2013): Heart rate, heart rate variability and behaviour of horses during air transport. *Veterinary Record*, 172(1):15.
- Murphy J., Arkins S. (2007): Equine learning behaviour. *Behavioural Processes*, 76(1):1-13.
- Ohmura H., Jones J. H. (2017): Changes in heart rate and heart rate variability as a function of age in Thoroughbred horses. *Journal of Equine Science*, 28(3):99-103.
- Padalino B. (2015): Effects of the different transport phases on equine health status, behavior, and welfare: A review. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(3):272-282.
- Padalino B., Riley C. B. (2020): The implications of transport practices for horse health and welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:202.
- Schmidt A., Biau S., Möstl E., Becker-Birck M., Morillon B., Aurich J., Faure J. M., Aurich C. (2010): Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(3):179-189.
-

- Shanahan S. (2003): Trailer loading stress in horses: behavioral and physiological effects of nonaversive training (TTEAM). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 6(4):263-274.
- Tateo A., Padalino B., Boccaccio M., Maggiolino A., Centoducati P. (2012): Transport stress in horses: Effects of two different distances. *Journal of Veterinary Behavior*, 7(1):33-42.
- von Lewinski M., Biau S., Erber R., Ille N., Aurich J., Faure J. M., Möstl E., Aurich C. (2013): Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: Different responses to training and performance. *The Veterinary Journal*, 197(2):229-232.
- Waran N. K., Cuddeford D. (1995): Effects of loading and transport on the heart rate and behaviour of horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 43(2):71-81.
- Yngvesson J., de Boussard E., Larsson M., Lundberg A. (2016): Loading horses (*Equus caballus*) onto trailers—Behaviour of horses and horse owners during loading and habituating. *Applied Animal Behaviour Science*, 184:59-65.

Paper received: 01.12.2023.

Paper accepted: 11.12.2023.

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 објављене 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 подијељени 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 редоследу 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 пружи 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 поткријеplени 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 штампи, 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. Символи 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 Бергеј-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 укосени и аутори би требало да консултују одговарајуће базе података генетске номенклатуре. Протеини обично нису у курзиву. Треба навести препоручени међународни заштићени 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 којој 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 then 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 sremeski 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>
