

YU ISSN 0350-2457
UDK 619 (05)

VETERINARSKI GLASNIK

**naučni časopis
scientific journal**

Veterinarski glasnik je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Veterinarski glasnik is published by Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade

VET. GLASNIK Vol. 61 Br. 3-4 Str. 135 - 248 Beograd, 2007.



IZDAVAČ:

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE UNIVERSITY OF BELGRADE
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЈ МЕДИЦИНИ УНИВЕРСИТЕТА В БЕЛГРАДЕ

SUIZDAVAČ: Veterinarska komora Srbije
COPUBLISHER: Veterinary Chamber of Serbia

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK – EDITOR IN CHIEF: *Vitomir Čupić*

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD:

Vojin Ivetić, Milovan Jovičin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Radoljub Tadić, Jadranka Tijanić, Dragiša Trailović

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Jadranka Tijanić*

LEKTORI – LECTORS:

Sanja Vranić, za srpski jezik / for Serbian language
Danijela Gledić, za engleski jezik / for English language
Boško Bošković, za ruski jezik / for Russian language



GODIŠNJE SE OBJAVLJUJE 6 BROJEVA ČASOPISA

Godišnja pretplata: za pravna lica 6 000 dinara
za individualne pretplatnike 2 000 dinara
za inostranstvo 200 USD
(The annual subscription outside Serbia and Montenegro is 200 US \$)

Žiro račun broj: 205-2982-66

U finansiranju časopisa učestvuje:

Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije
Publication of this journal is financially supported by:
Ministry of Science and Environmental Protection of Republic Serbia

Štampa – *Printers: SZR „Simić Zuhra”, Beograd, Vitanovačka 15*

Adresa časopisa:

Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik, 11000 Beograd,
Bulevar oslobođenja 18, tel/faks 011/2684-597, 2687-475,
e-mail: vetks@eunet.yu; www.vetks.org.yu

VETERINARSKI GLASNIK

VOL. 61

BROJ 3 - 4

STRANA 135 - 248

Beograd 2007.

3-4

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 61 Br. 3 - 4 str. 135 - 248 Beograd, 2007.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Cakić P., Paunović M., Đikanović Vesna, Jakovčev-Todorović Dunja, Simić V., Kulišić Z.:
Tipologija i monitoring ekološkog statusa tekućih voda Srbije
Typology and Monitoring of Ecological Status of Moving Waters of Serbia
Типология и мониторинг экологического статуса текучих вод Сербии. **137**

STRUČNI RADOVI – PROFESSIONAL PAPERS – СПЕЦИАЛИСТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

- Büyükkunal S. K., Nazlı B.: Effect of different electrical stunning methods on meat quality of marmara kivircik breed lamb in Turkey Republic
Efekti različitih metoda električnog omamljivanja na kvalitet mesa kod Marmara Kivircik jagnjadi u Turskoj
Эффекты различных методов электрического обомешения на качество мяса у Marmara Kivircik ягнят в Турции **155**
- Prodanov Jasna, Došen R., Petrović T., Lupulović Diana, Valčić M., Polaček V.: Značaj ustanovljavanja intrauterinih infekcija virusom klasične kuge svinja u sklopu programa suzbijanja i iskorenjivanja oboljenja
Significance of Determining Intrauterine Infections with Classical Swine Plague Virus Within Programme of Curbing and Eradicating this Disease
Значение установливания внутриматочных инфекций вирусом классической чумы свиней в составе программы преодоления и искоренения заболевания **163**
- Vučinić Marijana: Osnovni principi zaštite dobrobiti oglednih životinja
Basic Principles of Experimental Animals Welfare Protection
Основные принципы охраны благосостояния опытных животных **173**
- Spasojević Kosić Ljubica: Osnovni principi primene i interpretacije Ekg-a kod konja
Basic Principles of ECG Application and Interpretation in Horses
Основные принципы и интерпретации ЭКГ у лошадей **183**
- Petrov V., Alexandrov M., Lasarova S., Lyutskanov M.: Histopathological Investigations of Rabbit Colibacteriosis, Caused by Enteropathogenic *Escherichia coli* (O15:H-)
Histopatološka istraživanja kolibakterioze kod kunića izazvane enteropatogenom bakterijom *Escherichia coli* (O15:H-)
Гистопатологические исследования колибактериоза у кроликов, вызванные энтеропатогенной бактерией *Escherichia coli* (O15:H-) **193**

<ul style="list-style-type: none"> ■ Tsachev I., Simeonov R., Petrov V.: Infections with <i>Ehrlichia canis</i> and <i>Borrelia burgdorferi</i> in a Dog Infekcije bakterijama <i>Ehrlichia canis</i> i <i>Borrelia burgdorferi</i> kod jednog psa Инфекции бактериями <i>Ehrlichia canis</i> и <i>Borrelia burgdorferi</i> у одной собаки 	201	
<ul style="list-style-type: none"> ■ Michaylov G., Tsachev I., Petrov V.: Etiological, Clinical and Epidemiological Investigations of Dermatophytosis among Pets in the Region of Stara Zagora for the Period 2004-2006 Etiološka i kliničko-epidemiološka istraživanja prisustva dermatofita kod kućnih ljubimaca u regionu Stara Zagora u periodu 2004-2006. godine Этиологические и клиническо-эпидемиологические исследования присутствия дерматофитов у домашних любимцев в регионе Старая Загора в периоде 2004-2006 года 	211	
<ul style="list-style-type: none"> ■ Urumova Valentina, Lyutskanov M.: Etiological Structure and Epidemiological Monitoring of Bacterial Infections in Industrially Reared Birds in Bulgaria Etiološka struktura i epidemiološki nadzor bakterijskih infekcija kod industrijski gajene živine u Bugarskoj Этиологическая структура и эпидемиологический надзор бактериальных инфекций у промышленно разведённых сельскохозяйственных птиц в Болгарии 	219	
<ul style="list-style-type: none"> ■ Çetin Ö., Dümen E., Biçer H. H., Koçak Ö.: Ratio of Meat Preparates to Carcass in Cattle Slaughtered in Istanbul Odnos preparata mesa u odnosu na trupove goveda klanih u Istanbulu Отношение препарата мяса в отношении туловищ крупного рогатого скота убитых в Стамбуле 	229	
<p>DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKJE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE – ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТИ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ</p>		241
<p>UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS.</p>		245

**TIPOLOGIJA I MONITORING EKOLOŠKOG STATUSA
TEKUĆIH VODA SRBIJE***
*TYOLOGY AND MONITORING OF ECOLOGICAL STATUS OF
MOVING WATERS OF SEBIA*

P. Cakić, M. Paunović, Vesna Đikanović, Dunja Jakovčev-Todorović,
V. Simić, Z. Kulišić**

U radu se prikazuju istraživanja koja se sprovode u cilju primene Okvirne direktive o vodama Evropske Unije (EU). Podaci o zajednicama vodenih organizama, uz abiotičke parametre, koriste se za definisanje tipologije, tip specifično referentnih uslova i indeksa ekološkog statusa, što predstavlja osnovu za ustanovljavanje sistema monitoringa ekološkog statusa/potencijala voda u Srbiji. Rezultati sprovedenih istraživanja koriste se i u nastavku rada na izradi baze podataka o biodiverzitetu kopnenih voda na području Srbije. Istraživanja obuhvataju fitoplankton, fitobentos, vodene makrobeskičmenjake i ihtiofaunu, kao biološke elemente korišćene u procesu primene Okvirne direktive o vodama EU. Pored toga, paraziti riba su predmet istraživanja iz razloga što nivo parazitiranosti može značajno da utiče na strukturu zajednice, te se može koristiti kao biološki parametar ekološkog statusa/potencijala. Studija obuhvata sve tipove tekućih voda. Terenska istraživanja se obavljaju sa ciljem upotpunjavanja i kompletiranja podataka o pojedinim biološkim komponentama tekućih voda.

Ključne reči: tipologija, tekuće vode, referentni uslovi, ekološki indeks, biodiverzitet, biološki elementi kvaliteta, ekološki status

Uvod / Introduction

Hidrobiološka istraživanja koja su se realizovala predstavljaju kompleksnu ekološku studiju tekućih voda Srbije sa ciljem definisanja tipologije i tip

* Rad primljen za štampu 5. 11. 2007. godine

** Dr Predrag Cakić, mr Momir Paunović, mr Vesna Đikanović, mr Dunja Jakovčev-Todorović, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd; dr Vladica Simić, Prirodno-matematički fakultet, Odeljenje za biologiju, Univerzitet u Kragujevcu; dr Zoran Kulišić, Katedra za parazitologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

specifično referentnih uslova, kao i formulisanja indeksa ekološkog statusa. Takođe, doprinose procesu formiranja sistema monitoringa ekološkog statusa i nastavku rada na bazi podataka biodiverziteta vodenih ekosistema Srbije.

Aktivnosti na primeni Direktive o vodama Evropske Unije (DV) u Srbiji, tačnije, na izradi tipologije i definisanju referentnih uslova za tekuće vode, pokrenute su početkom 2004. godine. U protekle dve godine saradnici Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu i Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu bili su uključeni u pomenute aktivnosti. Prva faza primene DV obuhvatila je izradu sistema tipologije, primenu sistema na reke čije je slivno područje veće od 4000 km² i početak rada na definisanju tip specifično referentnih uslova. Zatim se pristupilo primeni sistema na vodotoke slivnog područja do 500 km². Tokom rada prikupljeno je mnogo podataka i bioloških uzoraka sa preko 300 lokaliteta sa različitih tekućica širom Srbije. Definisanje tipova tekućih voda na području Srbije jedan je od zadataka koje treba ispuniti sa ciljem prilagođavanja sistema upravljanja vodama smernicama koje su iznete u pomenutoj Direktivi i projektima koji su imali za cilj njenu primenu [1].

Tipologija voda prvi je korak u ustanovljavanju sistema u kome se stanje vodenih ekosistema i ekološki status procenjuju u odnosu na referentno stanje koje je specifično za svaki tip staništa/voda. Iz tog razloga je bitno da se uradi tipologija voda na teritoriji Srbije, kako bi se moglo pristupiti preduzimanju koraka koji vode ka planiranju, proveriti i primeni modernog i efikasnog sistema procene statusa vodenih ekosistema.

Tipologija voda, prema konceptu predloženom u Direktivi o vodama EU [2], predstavlja balans između realne raznovrsnosti voda koja je merljiva kroz abiotičke i biotičke karakteristike i nivoa pojednostavljenja odnosa u prirodi. Dodatan izazov u istraživanju vezanom za tipologiju tekućih voda predstavlja činjenica da je teritorija Srbije, prema opštim karakteristikama područja (geografski položaj, klima, reljef, geološka struktura, pedološki faktori, istorijski faktori) izrazito raznovrsna.

Podaci dobijeni ranijim istraživanjem vodenih makrobeskičmenjaka u Srbiji od značaja su za ostvarenje ciljeva ove studije. Istraživanje vodenih makrobeskičmenjaka u Srbiji ima dugu tradiciju, a vodeni ekosistemi opisivani su na različite načine, uključujući abiotičke faktore i biotu. Detaljan pregled istraživanja u Srbiji prikazan je u radovima Simića [3], Markovića [4, 5] i Paunovića i sar. [6].

Simić V. [3, 7], i Simić S. [7] prikazuju podatke o zajednicama makrobeskičmenjaka koji se mogu koristiti u tipologiji reka Srbije. U ovim radovima iznesene su i prateće fizičke i hemijske karakteristike ispitivanih tekućica. Kao rezultat sedmogodišnjeg istraživanja autori definišu pet grupa tekućih voda u okviru osam geografskih regiona.

Klasifikacija/tipologija površinskih kopnenih voda preduslov je za definisanje sistema procene ekološkog statusa okruženja koji je definisan Direktivom o vodama Evropske Unije [2]. Definisanje tipova tekućih voda na području

Srbije jedan je od zadataka koji treba ispuniti sa ciljem prilagođavanja sistema monitoringa smernicama koje su iznesene u pomenutoj Direktivi [2] i projektima koji su imali za cilj njenu primenu [8, 9, 10, 11].

Tokom realizacije ovih istraživanja namera nam je bila da primenimo iskustva ranijih klasifikacija vodenih ekosistema, preporuke iznete u Direktivi o vodama [2], ali i da uvažimo sve posebnosti prirode područja Srbije. Akcenat je stavljen na analizu zajednice vodenih makrobeskičmenjaka, kao grupe organizama koja je najintenzivnije upotrebljavana u drugim evropskim zemljama prilikom određivanja tipova i tip specifično referentnih uslova za tekuće vode.

Ciljevi istraživanja / Objectives of investigation

Na osnovu plana istraživanja i raspoloživih podataka, definisani su sledeći ciljevi istraživanja kako bi se ostvarila osnovna namera – tipologija/klasifikacija tekućih voda područja Srbije:

- izrada spiska vrsta i komentar o zabeleženoj flori i fauni u pogledu ekoloških i biogeografskih karakteristika, utvrđivanje osnovnih osobina zajednica, analiza prostorne dinamike i analiza uticaja hidromorfoloških pritisaka (npr. pregrađivanja, naselja) i pritoka na vodene makrobeskičmenjake,

- analiza zajednica fitoplanktona, fitobentosa, makrobeskičmenjaka i riba sa aspekta sastava i strukture, primena različitih bioloških i biotičkih indeksa kao bioloških elemenata kvaliteta predviđenih Direktivom o vodama,

- precizno povlačenje granice hidro-faunističkih oblasti (ekoregiona) koje odgovaraju opštim prirodnim i istorijskim karakteristikama područja i lokalnom rasprostranjenju vodenih organizama,

- podela teritorije Srbije na hidro-faunističke podoblasti, koje su, do određenog nivoa, homogene u pogledu karakteristika vodenih organizama (horizontalna distribucija hidrobionata) i

- tipologija ispitivanih tekućica.

U nameri da se ostvari pomenuti zadatak, planirane su i sledeće aktivnosti:

- priprema i praktična provera terenskog upitnika (protokola) za istraživanje vodenih makrobeskičmenjaka, koji obuhvata podatke o staništu (prateći podaci) i uzorcima,

- poređenje različitih tehnika uzorkovanja vodenih makrobeskičmenjaka,

- poređenje zajednica vodenih makrobeskičmenjaka ispitivanih područja i vodotokova,

- izbor referentnih lokaliteta i lokaliteta koji se, prema stepenu antropogenog uticaja, mogu okarakterisati kao "bliski prirodnim" ("near-natural" sites) i

- definisanje tip-specifično referentnih uslova za tekuće vode.

Jedna od aktivnosti je i prikupljanje podataka o hidro-morfološkim i drugim pratećim podacima o tekućim vodama područja Srbije. Ovo je definisano tokom realizovanja ovog istraživanja, jer smo pregledom dostupne literature o prirodnim karakteristikama tekućih voda Srbije ustanovili da odgovarajući podaci nisu dostupni u okviru jedne publikacije. Najkompletniji pregled tekućih voda u pogledu abiotičkih karakteristika prikazan je u monografiji Gavrilovića i Dukića [11]. Analizom podataka prikazanih u pomenutoj publikaciji uvideli smo da nedostaju podaci za veliki broj manjih brdsko-planinskih tekućica koje su za hidro-biološka istraživanja i najinteresantnije. Zbog toga smo se opredelili za to da rad sadrži i prikaz osnovnih abiotičkih karakteristika ispitivanih tekućica, u nadi da će taj deo doprineti da se makar jedan deo podataka nalazi sumiran na jednom mestu.

Metodologija / Methodology

Istraživanja obuhvataju fitoplanktone, fitoperifitone, vodene makrobeskičmenjake i ribe, kao biološke elemente široko korišćene u primeni DV u Evropi. Uz to, istraživanja parazita riba su takođe predmet ove studije, jer se nivo parazitiranosti može koristiti za procenu ekološkog statusa vodenog sistema.

Terenska istraživanja imaju za cilj prikupljanje biološkog materijala i podataka o ispitivanom lokalitetu/sektoru. U planiranju terenskih radova akcentat je stavljen na tekućice koje nisu bile obuhvaćene prethodnim istraživanjima na adekvatan način.

Metodologija koja se primenjuje obuhvata sakupljanje i obradu materijala i pratećih podataka. Zasnovana je na principima definisanim u DV, rezultatima projekata koji su imali za cilj primenu pomenute Direktive [8], kao i na dokumentima definisanim tokom rada stručnih grupa Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav [12]. Pored toga, prilikom definisanja programa istraživanja u razmatranje su uzeta iskustva drugih zemalja na polju primene DV [13].

Analiza osobenosti zajednica vodenih organizama podrazumeva sledeće momente: broj vrsta, gustina zajednica (kvantitativne i semi-kvantitativne tehnike), diverzitet, kao i polnu i uzrasnu strukturu za pogodne grupe organizama (ribe i rečni rakovi). Analiza parazita riba obuhvata istraživanje nivoa i tipa infekcije, sa ciljem da se odredi relacija između parazitiranosti i ekološkog statusa voda.

Detaljna analiza lokaliteta uzorkovanja je zasnovana na terenskom upitniku prilagođenom za potrebe studije i obuhvata prikupljanje podataka o morfološkim osobenostima profila (prosečna, minimalna i maksimalna širina, prosečna i maksimalna dubina, tip podloge, tip korita i način grananja) na sektoru od najmanje 50 m. Analiza zastupljenih tipova podloge vrši se vizuelnom procenom, u kvadratu 50x50 cm, po sistemu klasifikacije prilagođenom potrebama studije, s ciljem da se koristi skala koja opisuje tipove podloge koji realno utiču na distribuciju vodenih makrobeskičmenjaka. Kao osnova za modifikaciju služi skala za kla-

sifikaciju mineralnog supstrata (14, 15): 1) supstrati sitnih čestica (mulj i vrlo sitan pesak; čestice nisu vidljive golim okom; <0,125 mm); 2) sitan pesak (čestice vidljive golim okom; 0,125-0,5 mm); 3) krupan pesak (0,5-2 mm); 4) šljunak (2-16 mm); 5) oblutak (16-34 mm); 6) kamen (64-256 mm) i 7) stena (>256 mm). Na terenu se obavlja i merenje površinske brzine vode.

Kriterijumi za izbor lokaliteta uzorkovanja su sledeći: zastupljenost delova toka različitih karakteristika (vir, preliv, brzak), karakterističan lokalitet za sektor, raznovrsnost/ujednačenost staništa za makrobescičmenjake, opšte karakteristike obodne vegetacije, pristupačnost terena, uticaj zagađenja i dr.

Monitoring abiocena obuhvata sledeće pokazatelje: pH, električna provodljivost, rastvoreni kiseonik i zasićenost kiseonikom. Istraživanje obuhvata gotovo celu Srbiju - slivove Velike, Zapadne i Južne Morave, Nišave, Ibra, Velikog Rzava, Timoka, Save, Kolubare, Tise, Peka, Mlave, Porečke reke, kao i materijal prikupljen na glavnom toku Dunava i ekosistemima plavnog područja.

Fitoplankton / Phytoplankton

Fitoplankton, zastupljen brojnim porodicama algi u vodenim ekosistemima, predstavlja zajednicu sitnih organizama koji čitav svoj životni ciklus provode u slobodnoj vodenoj masi ekosistema, između površine i dna, plutajući. Ovi organizmi su sposobni za brojne adaptacije koje uslovljava plutajući način života. Fitoplankton se razvija u sporotekućim, ravničarskim rekama i jezerima, a nikada u brzim brdsko-planinskim tekućicama.

Prikupljanje fitoplanktona se vrši standardnim planktonskim mrežama, promera okaca 20-25 μ m. Voda se uzima sa određenog broja tačaka po prečnom profilu tekućice. Svi uzorci se proceduju kroz planktonsku mrežu i odlažu kao jedan zajednički uzorak [16].

Fitobentos / Phytobenthos

Fitoperifiton čine biljni predstavnici koji naseljavaju tvrde delove podloge (stene, kamen) i čvrsto su vezani za njih. Nazivamo ga obraštajem u kome se uglavnom sreću predstavnici silikatnih, modrozelenih i zelenih algi. Organizmi koji čine fitobentos sakupljaju se pomoću četkice ili noža laganim i pažljivim skidanjem, odnosno struganjem sa tvrde površine. Na terenu se prikupljeni materijal odmah fiksira formaldehidom do finalne koncentracije do 3-4%. Priprema diatoma za determinaciju urađena je prema Husted-ovoj metodi [17]. Identifikacija je obavljena korišćenjem invertnog mikroskopa Nikon, uvećanje 1500x.

Akvatični makrobescičmenjaci / Aquatic macroinvertebrate

Akvatični makrobescičmenjaci raznovrsna su i biološki heterogena grupa organizama. Veliki broj vrsta životinja koji obuhvata ova ekološka kategorija, raznovrsnost akvatičnih staništa u Srbiji, kao i relativno mali broj stručnjaka koji se kod nas trenutno bavi vodenim makrobescičmenjacima, doprineli su da su ovi hidrobionti slabo ispitani u poređenju sa stepenom istraženosti u većini sused-

nih zemalja. S toga, svaki napor u pravcu istraživanja akvatičnih makrobeskičmenjaka predstavlja doprinos u procesu upotpunjavanja znanja o vrstama koje su prisutne u Srbiji i njihovoj ekologiji.

Prikupljanje makrobeskičmenjaka obavlja se uz upotrebu ručnih bentosnih mreža promera okca 250 i 500 μm , *Sürber*-ovim mrežama zahvatnih površina 0,1 i 0,04 m^2 promera okca 250 μm , bentološkom dredžom mreže promera okca 250 μm , bagerima tipa Ekman i Van-Veen, zahvatnih površina 0,04 i 0,03 m^2 , kao i ručnim sakupljanjem i spiranjem materijala sa različitih površina.

Uzorkovanje ručnim bentološkim mrežama vrši se kombinovanom tehnikom podizanja materijala trzajima nogama sa podloge i njegovim sakupljanjem u mrežu koja je orijentisana u pravcu vodenog toka i ručnim sakupljanjem sa podloge (*kick & sweep* tehnika), semi-kvantitativnim uzorkovanjem u definisanom vremenskom intervalu, pri čemu je prikupljano sa svih dostupnih staništa, proporcionalno zastupljenosti staništa na sektoru [16].

U slučaju korišćenja *Sürber*-ovih mreža uzorak se sastoji iz tri zahvata po tipu staništa, pri čemu se vodi računa da materijal bude prikupljen sa tipa podloge koji je karakterističan za sektor [16].

Prilikom korišćenja bentoloških bagera, materijal se ispira kroz sito promera okca 250 μm , kako bi se odvojile sitne čestice od uzorka i omogućilo odlaganje i kvalitetnije fiksiranje i konzerviranje uzoraka [16].

Determinacija prikupljenih makrobeskičmenjaka obavlja se u hidrobiološkoj laboratoriji korišćenjem mikroskopa, uvećanja do 90x. Identifikacija organizama obavlja se pomoću adekvatnih ključeva do najnižeg pouzdanog taksonomskog nivoa (rod, vrsta) [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36] u laboratoriji Odeljenja za hidrobiologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", gde se materijal i čuva.

Ihtiofauna / Ichthyofauna

Primerci riba se izlovljavaju upotrebom mreža stajaćica i povlačnih mreža različitog promera okaca (32–50 mm), kao i korišćenjem agregata Honda (1,5 KW) za elektro-ribolov.

Parazitološka analiza materijala obavlja se na prikupljenim primercima riba. Kod svih jedinki pregledaju se škrge, trbušna duplja i crevni trakt radi utvrđivanja prisustva ekto- i endoparazitskih vrsta. Sve pronađene vrste Protozoa fiksiraju se metanolom i boje Giemzom nakon sušenja. Ostale pronađene parazitske vrste prosvetljuju se u laktofenolu i od njih se prave trajni preparati.

Za pregled riba koriste se uobičajene parazitološke metode [37]. Žive trematode i akantocefale se opuštaju u destilovanoj vodi na 4°C oko 1 sat i potom fiksiraju u 10% vreloom formalinu. Žive nematode se fiksiraju u vreloom 70% etanolu i čiste u vreloom laktofenolu. Zamrznuti primerci se odmrzavaju u vodi, a zatim fiksiraju u 10% formalinu (trematode i akantocefale), odnosno u 70% etanolu (nematode).

Identifikacija se obavlja na osnovu ključeva za identifikaciju parazita [38, 39, 40, 41, 42, 43].

Na analiziranom uzorku riba radi se ekstenzitet i intenzitet infekcije.

Rezultati rada / Results

Po obimu istraživanja **potamoplanktona** (fitoplankton u rekama), najistraženiji vodotokovi u našoj zemlji su Dunav, Sava i Tisa, dok pojedini manji vodotokovi kao što su Tamiš i Velika Morava skoro da uopšte nisu rađeni. Najčešće područje istraživanja Dunava i Save je područje Beograda (za Savu: Šabac-Beograd) ređe drugi delovi reke ili ceo tok kroz Srbiju. Slično je i sa Tisom, uz činjenicu da su najobimnija i najkompleksnija istraživanja vršena na delu toka Tise kod Bečeja. Takođe je neophodno istaći da se istraživanja Dunava, uslovno, mogu podeliti na istraživanje vodotoka pre i nakon izgradnje brana na Dunavu kod Đerdapa, i istraživanja područja Đerdapa koje nakon izgradnje brana na Dunavu ima drugačije karakteristike fitoplanktona. Istraživanja fitoplanktona reke Tamiš rađena su u više navrata duž celog toka kroz našu zemlju. Za Veliku Moravu skoro da ne postoje objavljeni podaci. Jedina istraživanja fitoplanktona Velike Morave rađena su 1977.-1979. godine [6].

Prema svojim hidromorfološkim i ekološkim karakteristikama može se zaključiti da postoje znatne razlike u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sastava fitoplanktona sporotekućih, ravničarskih reka (Dunav, Sava, Tisa, Tamiš i Velika Morava). Za sve ove reke zajedničko je da se kao dominantna grupa u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu izdvajaju Bacillariophyta, a kao subdominantna Chlorophyta čiji udeo u sastavu zajednice naročito raste u vreme letnjih meseci kada su vodostaji najniži, a temperatura i osvetljenost najveći [6].

Tokom razmatranja **vodenih makrobeskičmenjaka** upotrebljen je materijal prikupljan u periodu 1993.-2006. na 356 lokaliteta. Korišćen materijal obuhvata uzorke sa 192 lokaliteta prikupljen u periodu 2003.-2006. Podaci sa 113 lokaliteta dostupni su iz prethodnog perioda (1992.-2003.), a na osnovu istraživanja realizovanih u Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu i Odeljenju za hidroekologiju Instituta za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Materijal je prikupljan pretežno u kritičnim periodima za zajednicu makrobeskičmenjaka – vreme niskih i visokih voda.

Determinisan je materijal iz 420 uzoraka faune dna i pregledano je ukupno 40.120 jedinki. Zabeleženo je ukupno 452 taksona vodenih makrobeskičmenjaka svrstanih u 115 familija, odnosno 239 rodova. Prema broju vrsta, najznačajnija grupa na ispitivanim lokalitetima su vodeni insekti (337 taksona), među kojima se, prema raznovrsnosti, izdvajaju Trichoptera (95 vrsta), Diptera (78 taksona) i Ephemeroptera (73 vrste) [6].

Za izradu spiska vrsta korišćen je celokupni materijal. Tokom analize prostorne distribucije vodenih makrobescičmenjaka, u slučaju brdsko-planinskih tekućica, akcentat je stavljen na uzorke prikupljene u periodu proleća i ranog leta, kako bi se iz analize eliminisale razlike u zajednici do kojih dolazi usled vremenske dinamike. Ovaj period je izabran kao adekvatan za analizu faune ove grupe tekućih voda, jer je tada raznovrsnost najveća [4, 7, 44, 45, 18, 46, 6]. Pored toga, identifikacija materijala prikupljenog u periodu proleća i ranog leta je pouzdanija, jer tada dominiraju krupniji larveni i nimfalni stupnjevi, za razliku od perioda kasnog leta i jeseni, kada se beleži dosta larvi u prvom i drugom stadijumu razvića. Ova činjenica naročito je uočljiva u slučaju familije Baetidae (Ephemeroptera) [18, 46]. U gotovo svim uzorcima prikupljenim u brdsko-planinskim područjima tokom septembra i oktobra zabeleženo je dosta predstavnika roda *Baetis* koji su bili sitni i komplikovani za identifikaciju.

Analiza faune većih ravničarskih reka je, nasuprot brdsko-planinskim tekućicama, vršena pretežno u septembaru i oktobru (period niskih voda). Pored činjenice da se uzorci iz velikih reka lakše prikupljaju u periodu niskih voda, ovakvom izboru je doprinelo i to što se većina prethodnih istraživanja (2001. Zajedničko ispitivanje Dunava 1 – *JDS1 Joint Danube Survey 1*; 2001. Međunarodno ispitivanje Tise – *ITR International Tisza Research*; 2004. Istraživanje Dunava AquaTerra – *ADS AquaTerra Danube Survey*) obavljala u pomenutom vremenskom intervalu, kao i da je Zajedničko ispitivanje Dunava 2 – *JDS2 Joint Danube Survey 2* planirano za avgust i septembar 2007., čime se obezbeđuje poredivost podataka.

Zajednice makrobescičmenjaka Dunava i Save u beogradskom regionu su analizirane sa 10 lokaliteta i dobijeni rezultati su ukazali na dominantnu ulogu grupa Oligochaeta i Gastropoda [47].

Na osnovu dobijenih rezultata o kvalitativnom sastavu zajednica **fitobentosa** na lokalitetima istraživanih tekućica u različitim područjima Srbije (istočne, centralne, jugozapadnog i zapadnog dela), praćena je njihova prostorna distribucija. Modrozeleno alge (Cyanophyta) (33 taksona) su zabeležene na 44 lokaliteta na dnu 24 tekućice. Crvene alge (Rhodophyta) sa svojih osam taksona su registrovane na 21 lokalitetu, na dnu devet tekućica. Alge razreda Xanthophyta (šest taksona) naseljavaju dno šest tekućica i konstatovane su na 20 lokaliteta. Od zlatnih algi (Chrysophyta) je na dnu istraživanih tekućica nađena samo jedna vrsta (*Hydrurus foetidus*) i to na dnu četiri reke i šest lokaliteta. Zelene alge (Chlorophyta) (22 taksona) su zabeležene na 47 lokaliteta na dnu 18 tekućica. Vrsta *Chara vulgaris* (Charophyta) je nađena samo na području istočne Srbije u Stanjanskoj reci na dva lokaliteta [6].

Istraživanja **ihtiofaune** u Srbiji su sprovedena na 14 profila na rekama Drini (gornji i donji tok), Dunavu (od 1250 do 1297 r.km., beogradski region, uzvodno od "Đerdapa I", akumulacija "Đerdap II", nizvodno od brane "Đerdap II"), Savi (Šabac, Obrenovac-Makiš), Velikoj Moravi (Varvarin), Zapadnoj Moravi (selo

Prijanovići – gornji tok, Trstenik – donji tok) i Južnoj Moravi (Bujanovac i Donji Ljubeš) [6].

Analiza parazita riba obuhvata:

1) ekologiju parazitoza riba, vodozemaca, ljuskara i mekušaca iz reka, rezervoara i slatkovodnih jezera [48, 49];

2) biologiju, ekologiju, funkcionalnu morfologiju i razvoj parazita u ribama i drugim organizmima u vodi, kao i u pticama vezanim za vodena staništa koje su značajne u prenošenju parazita riba [50, 51, 52, 53];

3) opis i kvantifikaciju zajednice parazita [54];

4) vrste nađenih parazita u zajednici i strukturu zajednice parazita [54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61];

5) biogeografske aspekte koji utiču na geografsku rasprostranjenost parazita [54, 48, 49];

6) biomonitoring zagađenosti vode na osnovu zajednice parazita [48];

7) faktore koji utiču na populaciju parazita [49];

8) epidemiološke aspekte [60, 61];

9) pregled na parazitska oboljenja riba i uticaj parazita na populaciju domaćina [62, 63].

Zbog velike prisutnosti alohtonih vrsta riba u našim otvorenim vodama, posebna pažnja je posvećena procenjivanju prisustva endoparazita sledećih, a za našu faunu novih, ribljih vrsta: sivi tolstolobik (*Hypophthalmichthys nobilis*), beli tolstolobik (*Hypophthalmichthys molitrix*), beli amur (*Ctenopharyngodon idella*), babuška (*Carassius auratus gibelio*), bezribica (*Pseudorasbora parva*), američki somić (*Ameiurus nebulosus*), sunčanica (*Lepomis gibosus*) i šilo (*Syngnathus abaster*).

Problem postaje mnogo veći uvozom novih ribljih vrsta, naročito iz azijskih zemalja i SAD, a sa njima skoro potpuno nepoznatih parazitofauna riba. Prilikom istraživanja srpskog dela Dunava, na škragama sivog tolstolobika nađena je nova parazitska vrsta Copepoda (*Sinergasilus polycolpus*), koja je ujedno i prvi nalaz za parazitofaunu Srbije [64]. Na ribljoj vrsti *Barbus meridionalis*, uhvaćenoj u reci Uvac, nađena je nova parazitska nematoda *Philometroides barbi* sp. nov. [65].

Ispitivanju parazitske faune riba prirodnih voda (potoci, reke, jezera i bare) mora se posvetiti veća pažnja, ne samo zbog njihovog ekonomskog i privrednog značaja, već da bi proučavanjem ove faune došli do novih saznanja o ribljim parazitima u prirodnim vodenim ekosistemima.

Diskusija / Discussion

Tipologija tekućih voda Srbije, pored podataka o fizičko-hemijskim karakteristikama ispitivanih vodotokova, urađena je i na osnovu raspoloživih i kompletnih podataka o analiziranim zajednicama akvatičnih makrobescičmenjaka, kao elemenata biološkog kvaliteta predviđenih Direktivom o vodama.

Analiza podataka vršena je na izabranim uzorcima akvatičnih makrobeskičmenjaka, u zavisnosti od cilja postupka. U zavisnosti od svrhe analize, izabrani su uzorci koji potiču sa lokaliteta koji se nalaze u okviru reka, ili pojedinih sektora tekućica, koje su slične prema karakteristikama – slična nadmorska visina (ista klasa nadmorske visine) i slične hidro-morfološke karakteristike. Prilikom analize prostorne distribucije vodenih makrobeskičmenjaka korišćeni su podaci koji potiču sa lokaliteta koji nisu pod bitnim uticajem zagađenja. Tako su upotrebljeni podaci, uglavnom, sa referentnih lokaliteta ili lokaliteta čiji se status može okarakterisati kao "blizak prirodnom" [6]. U slučajevima kada nisu bili dostupni podaci sa referentnih lokaliteta, korišćeni su i podaci sa lokaliteta čiji se ekološki status može preliminarnom procenom okarakterisan kao visok [6].

Za izračunavanje korišćenih bioloških indeksa korišćen je AQEM program [1].

Baza podataka / Database

Baza podataka biodiverziteta vodenih ekosistema Srbije razvijena je na Institutu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu [66].

U periodu od 2000., u okviru redovnih aktivnosti formirana je i redovno ažurirana Baza podataka o biodiverzitetu vodenih ekosistema Srbije ("ADSer").

Osnovnu strukturu kompjuterske baze podataka (ADSer), čine zapisi o vrstama hidrobionata i to: makroalgi, makrobeskičmenjaka, riba, vodozemaca i gmizavaca koje su konstantovane u kopnenim vodama Srbije.

Unešeni podaci o vrstama su dvojakog porekla i to:

1. publikovani bibliografski podaci o dosadašnjim istraživanjima gore pomenutih hidrobionata na području Srbije i to počevši od 1860. do 2005. godine.

2. podaci o istraživanjima akvatičnih makrobeskičmenjaka tokom poslednje 3 godine istraživanja, a koji nisu do sada publikovani.

Zapisi uneseni u bazu za svaki obrađeni takson su sledeći:

1. tačan naziv taksona,
2. identifikacioni broj taksona (ID taksona),
3. godina nalaza,
4. broj nalaza tokom godine u kojoj je nađen (učestalost nalaza),
5. relativna brojnost taksona izražena prema sledećoj skali:

Učešće vrste / <i>Specie participation</i>	Oznaka relativne brojnosti / <i>Mark of relative numerousness</i>	Broj individua / <i>Number of specimens</i>
Manje od 3 / <i>Under 3</i>	1	1-10
3-10	2	10-50
10-20	3	50-150
20-40	4	150-500
40-100	5	vise od 500 / <i>more than 500</i>
ne postoji podatak / <i>no data</i>	NP	ne postoji podatak / <i>no data</i>

6. tip ekosistema gde je vrsta konstantovana,
 7. podatak o statusu ugroženosti (ako postoji, baza IUCN, zakon o retkim i ugroženim vrstama Republike Srbije),
 8. podatak o UTM i geografskom položaju (GPS – podaci) staništa gde je vrste nađena,
 9. podaci o autoru i publikaciji.
- Prema analizi izvršenoj 01.10.2005. godine baza podataka biodiverziteta vodenih ekosistema Srbije sadrži sledeće:
1. ukupan broj zapisa koji je unet u bazu o svim taksonima po ekosistemima iznosi 12.443,
 2. ukupan broj zapisa za makrobeskičmenjake po svim ekosistemima je 8.715,
 3. ukupan broj zapisa za ribe po svim ekosistemima je 3.587,
 4. ukupan broj zapisa za vodozemce po svim ekosistemima je 141,
 5. ukupan broj obuhvaćenih vrsta makrobeskičmenjaka je 1.657,
 6. ukupan broj vrsta riba o kojima postoji zapis je 155,
 7. ukupan broj vrsta vodozemaca o kojima postoji zapis je 32.

Podaci iz ažurirane baze podataka služe za:

1. analizu abiotičke tipologije tekućica, koja je izrađena na osnovu sistema tipologije predloženog 2004. godine,
2. izdvajanje referentnih lokaliteta i lokaliteta čije se stanje može okarakterisati kao "blisko prirodnom",
3. kao i za definisanje granica ekoregiona i
4. hidro-ekoloških celina na području Srbije.

Kako se ostvarenje aktivnosti na formiranju i popunjavanju ADSer vrši od 2000. godine i kako baza sadrži podatke potrebne za nastavak rada na primeni DV, a u oblasti korišćenja bioloških elemenata kvaliteta (BQE), saradnja na usavršavanju ADSer opravdana je metodološki i ekonomski.

*Podela teritorije Srbije na hidrofaunističke oblasti i podoblasti /
Division of the territory of Serbia into aquatic fauna areas and subareas*

Prema korigovanim granicama, broj ekoregiona na teritoriji Srbije ostaje nepromenjen u odnosu na izvornu verziju Illies-a [26]. Teritorija Srbije

obuhvata 5 ekoregiona (Slika 1). Ekoregion 5 – Dinarski zapadni Balkan; ekoregion 6 – Helenski zapadni Balkan; ekoregion 7 – Istočni Balkan; ekoregion 10 – Karpati; i ekoregion 11 – Panonska nizija.

Izvršena je podela Srbije na hidrofaunističke podoblasti na osnovu postojećih abiotičkih podataka i informacija o bioti. Od bioloških parametara predviđenih Direktivom o vodama odabrani su vodeni makrobeskičmenjaci, koji se predlažu za multimetrijski sistem procene ekološkog statusa.



Za sada je izvršena analiza efikasnosti tehnika uzorkovanja; izrađena je operacionalna lista taksona za makrobeskičmenjake; izvršena je valorizacija tipologije izrađene na osnovu abiotičkih faktora, a na osnovu rasprostranjenja vodenih makrobeskičmenjaka. Tipologija vodotoka na području Srbije urađena je postepeno kroz analizu rasprostranjenja akvatičnih makrobeskičmenjaka u odnosu na tipološke parametre (nadmorska visina, veličina sliva, geologija, pripadnost većem slivu, pripadnost ekoregionu).

Zaključak / Conclusion

Prikupljeni materijal i dobijeni rezultati istraživanja su osnov za dalje usavršavanje tipologije tekućih voda na područje Srbije, kao i za definisanje tip specifično referentnih uslova za izabrane parametre za tekuće vode. Na osnovu analize zajednica fitoplanktona, perifitona, vodenih makrobeskičmenjaka i ihtiofaune radi se na definisanju granica ekoregiona za teritoriju Srbije. U pogledu kvaliteta vode, vrši se definisanje novih indikatorskih grupa i redefinisane indika-

torskih vrednosti za stare grupe bioindikatora. Rezultati se upotpunjuju izradom testiranja novog ekološkog indeksa zasnovanog na Balkanskom biotičkom indeksu (BNBI) i primenom ovog indeksa u monitoringu ekološkog statusa tekućih voda u regionu.

Svakako, značajna karika u sagledavanju ekološkog statusa voda Srbije je i poznavanje parazitofaune riba. Takođe se nastavlja rad na bazi podataka o biodiverzitetu kopnenih voda područja Srbije izrađenoj na Institutu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Namera studije je da se predloži tipologija, tip specifično referentni uslovi i indeks ekološkog statusa koji bi bili pogodni za dalje poboljšanje i korišćenje u usavršavanju nacionalnog sistema monitoringa i sistema upravljanja vodama.

Rezultati sprovedenih istraživanja u znatnoj meri doprinose procesu primene Direktive o vodama EU na području Srbije.

Prikazane aktivnosti i dobijeni rezultati dosadašnjih istraživanja su delom obuhvaćeni u okviru Projekta 143023 – "Tekuće vode Srbije - istraživanje biodiverziteta i korišćenje podataka u tipologiji, izradi ekološkog indeksa i monitoringu ekološkog statusa".

Literatura / References

1. AQEM: Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Contract No: EVK1-CT1999-00027, 2002. - 2. WFD: Water Framework Directive - Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy, 2000. - 3. Simić V.: Mogućnosti ekološkog monitoringa rečnih ekosistema Srbije na osnovu makrozoobentosa. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Beograd, 1-612, 1996. - 4. Marković Z.: Reka Đetinja, makrozoobentos u oceni kvaliteta vode. Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije i Naučnoistraživački centar Užice, Užice, 131, 1995. - 5. Marković Z.: Izvori brdsko-planinskih područja Srbije, ekološka studija makrozoobentosa. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 318, 1998. - 6. Paunović M., Simić V., Simonović P., Cvijan M., Subakov G., Simić S., Stojanović B., Petrović A., Gačić Z.: Biološki elementi u procesu primene Direktive o vodama EU za područje Srbije. Izveštaj po ugovoru 01-470-2006, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd, 254, 2006c. - 7. Simić V., Simić S.: Use of the river macrozoobenthos of Serbia to formulate a biotic index. *Hydrobiologia*. 416, 51-64. Netherlands, 1999. - 8. AQEM: Stream assessment methods, stream typology approaches and outlines of a European stream typology. 1 st deliverable, Contract No: EVK1-CT1999-00027, 2000. - 9. AQEM: Experiences with different stream assessment methods and outlines of an integrated method for assessing streams using benthic macroinvertebrates. 3rd deliverable, Contract No: EVK1-CT1999-00027, 2001. - 10. AQEM: Reference biocoenoses and deviations: structure and tools for description, 2nd deliverable, due to 28/2/01, Contract No: EVK1-CT1999-00027, 2001a. - 11. Gavrilović Lj., Dukić D.: Reke Srbije. Zavod za udžbenika i nastavna sredstva, pp. 7-218. Poglavlje: Reke Crnomorskog sliva, Zapadna Morava, 84-85, 2002. - 12. SCG ICPDR National Report: National Report of Serbia and Montenegro – ICPDR Roof Report, Part B. www.icpdr.org, 2004. - 13. Moog O. (ed.): Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autecologischen Einfung. Aq-

- uatischer Organismen Osterreichs. Teil II B, Metazoa, Saprobielle Valenzen, 1995. - 14. Verdonschot P. F. M.: Micro-distribution of oligochaetes in a soft-bottomed lowland stream (Elsbeek; The Netherlands). *Hydrobiologia*, 406, 149-163, 1999. - 15. Wentworth C. K.: A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30, 377-392, 1922. - 16. Tripković D., Ignjatović J., Cvijan M., Nadeždić M., Maljević E., Paunović M.: Strategija monitoringa kvaliteta površinskih voda. Regionalni centar za životnu sredinu za centralnu i istočnu Evropu, Kancelarija u Srbiji i Crnoj Gori, Beograd, 106, 2003. - 17. Krammer K., Lange-Bertalot H.: Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. U. Süßwasserflora von Mitteleuropa. (Ettl., H., Gerloff, K., Heynig, H., Mollenhauer, D., Eds.) Band 2/1. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 66, 1986. - 18. Paunović M., Jakovčev-Todorović D., Simić V., Stojanović B., Veljković A.: Species composition, spatial distribution and temporal occurrence of mayflies (Ephemeroptera) in the Vlasina River (Southeast Serbia). *Arch. Biol. Sci.* 58, 1, 37-43, 2006a. - 19. Belfiore C.: Ephemeropteri (Ephemeroptera). Guide per il Riconoscimento Delle Specie Animali Delle Acque Interne Italiane. Consiglio Nazionale Della Ricerca AQ/1/201, 112, 1983. - 20. Brinkhurst R. O.: A guide for the identification of British Aquatic Oligochaeta. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 22, Second Edition. 55, 1971. - 21. Croft P. S.: A key to the major groups of British freshwater invertebrates. *Field Studies* 6, 531-579, 1986. - 22. Edington J. M., Hildrew A. G.: Caseless caddis larvae of the British Isles. A key with ecological notes. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 53 (ed. J.M. Elliott), 143, 1995. - 23. Fres C. O. H.: The dragonflies of Great Britain and Ireland. Harley Books (B.H. & A. Harley Ltd.), second edition. 116, 1997. - 24. Hynes H. B. N.: A key to the adults and nymphs of the British Stoneflies (Plecoptera) with notes on their Ecology and Distribution. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 17. The third edition, with minor revision, 1977. 90, 1977. - 25. Ikononov P.: Ephemeroptera na Makedonija. Sistematika i faunistika. II Prilozi (slike i dijagrami). Skopje, 109, 1959. - 26. Illies J.: Limnofauna Europea. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York Swets & Zeitlinger B.V. Amsterdam, 534, 1978. - 27. Kerovec M.: Priručnik za upoznavanje beskralješnjaka naših potoka i rijeka. SNL, Zagreb, 127, 1986. - 28. Ložek V.: Ključ Československých Mekkyšu. Vyda Vatelstvo Slovenskej Akademie Vied, sekcia biologických a lekarských vied, Bratislava. 437, 1956. - 29. Macan T. T.: A key to the nymphs of the British species of Ephemeroptera with notes of their ecology. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 20, second edition, 69, 1970. - 30. Müller-Liebenan I.: Revision der europäischen Arten der Gattung *Baetis* Leach, 1815 (*Insecta, Ephemeroptera*). HEFT 48/49, 214, 1969. - 31. Nilsson A.: Aquatic Insects of North Europe – A Taxonomic Handbook, Volume 1. Apollo Books, Stenstrup. 274, 1997a. - 32. Nilsson A.: Aquatic Insects of North Europe – A Taxonomic Handbook, Volume 2. Apollo Books, Stenstrup. 440, 1997b. - 33. Pflieger V.: A field guide in colour to Molluscs. Over 160 illustrations in full colour. Aventinum nakladatelství, 216, 1990. - 34. Savage A. A.: Adults of the British aquatic Hemiptera Heteroptera: a key with ecological notes. Freshwater Biological Association Scientific publication 50. 173, 1989. - 35. Timm T.: Eesti rongusside (Annelida) määraja. [A guide to the Estonian Annelida]. Naturalist handbooks I. Estonian Academy Publishers, Tallinn. 1-208, 1999. - 36. Wallace I.D., Wallace B., Philipson G. N.: A key to the case-bearing caddis larvae of Britain and Ireland. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 51 (ed. J.M. Elliott). 237, 1990. - 37. Stoskopf, M.: Fish Medicine. W.B. Saunders Company, 1993. - 38. Bauer O. N.: The guide for identification of parasites of freshwater. Fish fauna of SSSR, Tom I, Akademiya Nauk SSSR. Zoologicheskij Institut, Leningrad, 1984. - 39. Bauer O. N.: The guide for identification of parasites of freshwater. Fish fauna of SSSR, Tom II, Akademiya Nauk SSSR. Zoologicheskij Institut, Leningrad, 1985. - 40. Bauer O. N.: The guide for identification of parasites of freshwater. Fish fauna of SSSR, Tom III, Akademiya Nauk SSSR. Zoologicheskij Institut, Leningrad, 1987. - 41. Bykhovskaya-Pavlovskaya I. E., Gusev A. V., Dubinina M. N., Izyumovan A., Smirnova T. C., Sokolovskaya I. L., Shtein G. A., Shulman S. S., Epshtajn V. M.: The guide for determination of parasites of fresh water fish of

- SSSR. Akademiya Nauk SSSR. Zoologicheskij Institut, Leningrad, 1962. - 42. Lom J., Dykova I.: Protozoa parasites of economically important fish species. Fisheries society of the Czech Republic, Prague, 102, 1989. - 43. Moravec, F.: Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe, Kluwer Acad. Publ., 172-173, 195-198, 377-380, 396-399, 1994. - 44. Paunović M., Kalafatić V., Jakovčev D., Martinović-Vitanović V.: Periphyton and Benthos of the Vlasina River. 32 Konferenz der IAD, SIL, Wien, Wissenschaftliche Referate, 193-198, 1997. - 45. Paunović M., Kalafatić V., Jakovčev D., Martinović-Vitanović V.: Oligochaetes (Annelida, Oligochaeta) of the Vlasina river (South-East Serbia): diversity and distribution. Biologia, Bratislava, 58, 903-911, 2003. - 46. Paunović M., Jakovčev-Todorović D., Simić V., Stojanović B., Petrović A.: Trophic relation between macroinvertebrates in the Vlasina River (Serbia). Arch.Biol.Sci., Belgrade, 58, 2, 105-114, 2006b. - 47. Jakovčev-Todorović D., Paunović M., Stojanović B., Simić V., Đikanović V., Veljković A.: Observation of the water quality of the Danube in Belgrade Region based on benthic animals – high and low water condition periods, 2002. Archive of Biological Sciences, 57, 3, 237-241, 2005. - 48. Gelnar M., Sebeleva S., Dusek L., Koubkova B., Jurajda P., Zahradkova S.: Biodiversity of parasites in freshwater environment in relation to pollution. Parassitologia, 39, 3, 189-199, 1997. - 49. Hakalahti T., Karvonen A., Valtonen E. T.: Climate warming and disease risks in temperate regions - *Argulus coregoni* and *Diplostomum spathaceum* as case studies. J Helminthol., 80, 2, 93-98, 2006. - 50. Kulišić Z., Cakić P., Đikanović V., Paunovic M., Stojanovski S., Jovanović M.: Role of gulls (*Larus ridibundus* L.) in the epizootiology of parasitic infections in fishes. VII National Conference of Parasitology, Sofia, Bulgaria, Program and abstracts, 101, 2005. - 51. Kulišić Z., Lepojev O.: Trematodes of wild duck (*Anas platyrhynchos* L.) in the Belgrade area. Acta Veterinaria (Belgrade), 44, 5-6, 323-329, 1994. - 52. Kulišić Z., Lepojev O., Aleksić-Bakrač N., Jakić D., Pavlović I., Milutinović M., Mišić Z.: Trematodes of the Eurasian coot *Fulica atra* in the Belgrade area. Acta Veterinaria, Belgrade, 54, 5-6, 447-456, 2004. - 53. Kulišić Z., Petrović Z., Brglez J., Lepojev O., Savin Ž.: Trematodes of gulls (*Larus ridibundus* L.) in Belgrade area. Acta Veterinaria (Belgrade), 41, 2-3, 129-134, 1991. - 54. Cakić P.: Paraziti riba u vodama Sjeničko - Pešterske visoravni i mogućnosti njihovog suzbijanja. Doktorska disertacija, Katedra za parazitologiju, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1992. - 55. Cakić P., Alimpijević S., Kulišić Z., Kataranovski D.: *Dichelestium oblongum* (Abildgaard, 1794), a new copepod species in the fauna of ichthyoparasites Yugoslavia. Fourth international symposium of ichthyoparasitology. Institute for Zoology, Fish Biology and Fish Diseases University of Munich, Germany, 15, 1995. - 56. Cakić P., Martinović-Vitanović V., Kataranovski D., Stojanovski S.: *Ancyrocephalus paradoxus* Creplin, 1839 (Monogenea), a new species for ichthyoparasite fauna of Yugoslavia. Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, 1, 317-320, 1999. - 57. Cakić P., Stojanovski S., Kataranovski D., Fišter, S.: The Balkan barbel (*Barbus meridionalis petenyi*), a new host of a nematode *Philometroides cyprini* (Ishii, 1931) and *Philometroides lusiana* (Vismanis, 1966). Second International Congress of the Biodiversity, Ecology and Conservation of the Balkan Fauna, Ohrid, 71, 1998. - 58. Cakić P., Stojanovski S., Kulišić Z., Hristovski N., Lenhardt M.: Occurrence of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) in eels of Lake Ohrid, Macedonia. Acta Veterinaria (Belgrade), 52, 2-3, 163-169, 2002a. - 59. Cakić P., Stojanovski S., Petrović Z., Lenhardt M., Fišter S.: The first record of parasite Nematode genus *Philometroides* on Yugoslav freshwater fish. Journal of Experimental Pathology and Parasitology, 5, 8, 3-6, Bulgaria, 2002b. - 60. Marković M., Kulišić Z., Palić K.: Most common trematodosis in herbivore fishes - Proceedings of Symposium on Veterinary Clinical Pathology and Therapy Clinica Veterinaria, Macedonia, Ohrid, 216-217, 2005a. - 61. Marković M., Kulišić Z., Palić K., Radojčić M.: Diphyllbothridae of fish and possible infection of humans – Proceedings of Symposium on Veterinary Clinical Pathology and Therapy Clinica Veterinaria, Macedonia, Ohrid, 215, 2005b. - 62. Bagge A.M., Poulin R., Valtonen E.T.: Fish population size, and not density, as the determining factor of parasite infection: a case study. Parasitology, 128, 3, 305-313, 2004. - 63. Valtonen E. T., Koskivara M.: Relationships be-

tween the parasites of some wild and cultured fishes in two lakes and a fish farm in central Finland. *Int J Parasitol.*, 24, 1, 109-118, 1994. - 64. Cakić P, Lenhardt M., Kolarević J.: *Sinergasilus polycolpus*, a new copepod species in the ichthyoparasitofauna of Serbia and Montenegro. *Diseases of aquatic organisms*, 58, 265-266, 2004. - 65. Moravec F., Šimkova A., Henzelova V., Špakulova M., Cakić P.: *Philometroides barbi* sp. nov. (Nematoda, Philometridae) from *Barbus meridionalis*, a new philometrid from European freshwater fish. *Acta Parasitologica*, 50, 4, 319-322, 2005. - 66. <http://147.91.203.19/index.html>.

ENGLISH

TYOLOGY AND MONITORING OF ECOLOGICAL STATUS OF MOVING WATERS OF SERBIA

P. Cakić, M. Paunović, V. Djukanović, D. Jakovčev-Todorović, V. Simić, Z. Kulišić

The paper presents work carried out with the objective of the implementation of the European Union Water Framework Directive. The data on communities of water organisms, together with the abiotic parameters, are used to define the typology, the type of specific reference conditions and the ecological status index, which present a basis for establishing a system of monitoring the ecological status/potential of the waters in Serbia. The results of the obtained investigations are used also in the continuation of this work in making a database on the biodiversity of landlocked bodies of water in the territory of Serbia. The investigations include phytoplankton, phytobenthos, aquatic macroinvertebrate, and ichthyofauna, as well as the biological elements used in the process of the implementation of the EU Water Framework Directive. Furthermore, fish parasites are a subject of investigations for the reason that the level of parasite presence could have a significant effect on the structure of the community, and can consequently be used as a biological parameter for the ecological status/potential. The study covers all types of moving water. Field research is conducted with the aim of compiling complete data on certain biological components of moving waters.

Key words: typology, moving waters, reference conditions, ecological index, biodiversity, biological elements of quality, ecological status

РУССКИЙ

ТИПОЛОГИЯ И МОНИТОРИНГ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ТЕКУЧИХ ВОД СЕРБИИ

П. Цакич, М. Паунович, В. Джуканович, Дуња Яковчев-Тодорович, В. Симич, З. Кулишич

В работе показываються исследования, проводимые с целью применения Приблизительной директивы о водах Европейской Унии (ЕУ). Данные о сообществах водных организмов, при абиотических параметрах, пользуются для дефиниции типологии, тип специфично референтных условий и индекса экологического статуса, что представляет собой основу для устанавливания системы мони-

торинга экологического статуса / потенциала вод в Сербии. Результаты проведённых исследований используются и в продолжении работы на быработке базы данных о биоразнообразности сухопутных вод территории Сербии. Исследования охватывают фитопланктон, фитобентос, водяные макробезпозвоночные, ихтиофауну, как биологические элементы, использованные в процессе применения Приблизительной директивы о водах ЕУ. При этом, паразиты рыб предмет исследования на основании, что уровень паразитиранности может значительно влиять на структуру сообщества, и может значительно влиять на структуру сообщества, и может использоваться как биологический параметр экологического статуса / протенциала. Исследование охватывает все типы текучих вод. Исследования на месте делаются с целью пополнения и комплектования данных о некоторых биологических компонентов текучих вод.

Ключевые слова: типология, текучие воды, рефернтные условия, экологический индекс, биоразнообразие, биологические элементы качества, экологический статус

**EFFECT OF DIFFERENT ELECTRICAL STUNNING
METHODS ON MEAT QUALITY OF MARMARA KIVIRCIK
BREED LAMB IN TURKEY REPUBLIC***
*EFEKTI RAZLIČITIH METODA ELEKTRIČNOG OMAMLJIVANJA NA
KVALITET MESA KOD MARMARA KIVIRCIK JAGNJADI U TURSKOJ*

S. K. Büyükcunal, B. Nazli**

The effects of head-only electrical stunning method were compared with the effects of head- to- back electrical stunning method. A total of 90 kivircik breed lambs were randomly allocated immediately prior to slaughter to one of three stunning treatments: control group (C), head only group (HO; 1.0 A- AC for 3 s at a frequency of 50 Hz), head to back group (HB; 1,0 A- AC for 3 s at a frequency of 50 Hz) electrical stunning. Meat quality was assessed by examining pH, colour as L, a, b values, water holding capacity (WHC) and shear force.

The effect on meat quality was assessed in head-only electrically stunned, head to back electrically stunned and non-stunned lambs. Shear forces were not significantly different between treatments. However colour (L,a*,b*), water holding capacity (WHC) and muscle ultimate pH were found to be significantly higher ($P < 0.05$) between the groups.*

Key words: lamb, electrical stunning, meat, quality

Introduction / Uvod

Pre-slaughter stunning is compulsory according to EU Council Directive 93/119 [4]. Protecting welfare in the pre-slaughter period, and protecting slaughterhouse workers against animals' reflex movement, lambs are not slaughtered without stunning in slaughterhouses [1, 20]. At the same time this practice may affect the meat quality like the type of suckling, lairaging, transport condition and handling such extrinsic factors are likely to affect meat quality through stress, which decreases muscular glycogen reserves, a process which may lead to high

* Rad primljen za štampu 30. 01. 2008. godine

** S. K. Büyükcunal, B. Nazli, Istanbul University Veterinary Faculty, Department of Food Hygiene and the Technology, Istanbul, Turkey

ultimate pH of meat [2]. Electric stunning is the most common commercially used method in the EU. There are several methods used to apply the electrodes used with electrical stunning apparatus like head-only, head-to-brisket and head-to-back [7].

Electrical stunning methods are effective and produce instantaneous insensibility by the induction of epileptiform activity in the brain [8]. The few studies on sheep examine the effect of the type of stunning on bleeding efficiency [9], petechial haemorrhages [6], blood pressure and muscular activity [16], final pH [14], meat quality parameters such as colour, tenderness, juiciness [20] and meat quality parameters, the presence of haemorrhages and the bone fractures [18] but not different electrical stunning methods effects on meat quality parameters.

Materials and methods / Materijal i metode ispitivanja

Animals / Životinje

Ninety male lambs of the Kivircik breed from the flock of the Experimental Farm of Istanbul University were slaughtered at 5 months of age. Animals were separated into three group (n = 30 each) for pre-slaughter handling. In the first group, the lambs were slaughtered without previous stunning. The second group was electrically stunned by the head only method at 1 A for 3 s. The other group was electrically stunned by the head to back method at 1 A for 3 s. Immediately after stunning, the lambs were slaughtered using conventional procedures. The carcasses were chilled at 6°C for 24 h in a conventional chiller.

Measurement / Merenje

Instrumental meat quality was assessed in the M. longissimus dorsi between 11.12. thoracal vertebrae.

The pH was measured rapidly after carcass dressing (pH 0), 45 minutes later (pH 45), 4 hours later (pH 4), 24 hours later (pH 24), 48 hours later (pH 48) and 72 hours later (pH 72) with a penetrating electrode adapted to a portable Hanna HI 8314 electro pH meter.

Twenty-four hours post mortem, the M. longissimus dorsi was removed from the carcass after measuring pH₂₄, and cut into four equal portions. One portion packed in a plastic tray over-wrapped with permeable gas film and stored at 3 °C prior to analysis for initial meat quality. Twenty-four hours post mortem water holding capacity (WHC) and colour (as *L*, *a*, *b* values), 72 hours post mortem shear force (SF) were determined.

The rest of the samples were vacuum packed in Cryovac barrier bags. Samples were taken, as required at 24h, 48h and 72h. During this time the bags were stored at 3°C.

The samples were analysed for pH, colour, WHC as percentage free water [20]. SF was evaluated using an Instron Texture Analyser (model 1140)

equipped with a kremear shear head. Samples were read at 500 kg load cell and 50 range.

Data Analysis / Analiza podataka

The data of the meat quality variables were analysed by the SPSS [17], using the analysis of variance (ANOVA).

Results and discussion / Rezultati i diskusija

Results of the effect of pre slaughter handling (PSH) during ageing on the meat parameters are presented in Tables 1-4.

Table 1. Effect of pre-slaughter handling and ageing on the pH of meat in Marmara Kivircik lambs /

Tabela 1. Efekat rukovanja pre klanja i zrenja na pH mesa kod Marmara Kivircik jagnjadi

Groups Parameters / Grupe Parametri	C (n=30) $\bar{x} \pm s$	HO (n=30) $\bar{x} \pm s$	HB (n=30) $\bar{x} \pm s$	F-value / F-vrednost
0 minute / 0 minuta	7.05 ± 0.050	7.04 ± 0.047	7.03 ± 0.064	2.024ns
45th minute / 45 minuta	6.91 ± 0.040a	6.74 ± 0.053c	6.79 ± 0.045b	104.357***
2nd hour / 2 sata	6.79 ± 0.050a	6.55 ± 0.057c	6.60 ± 0.052b	165.498***
3rd hour / 3 sata	6.68 ± 0.060a	6.38 ± 0.076c	6.43 ± 0.096b	119.686***
4th hour / 4 sata	6.57 ± 0.060a	6.22 ± 0.093b	6.26 ± 0.080b	172.557***
8th hour / 8 sati	6.33 ± 0.080a	5.91 ± 0.108b	5.83 ± 0.048c	311.081***
12th hour / 12 sati	6.05 ± 0.100a	5.70 ± 0.107b	5.64 ± 0.036c	198.139***
24th hour / 24 sata	5.83 ± 0.040a	5.79 ± 0.049b	5.79 ± 0.034b	7.582***
48th hour / 48 sati	5.92 ± 0.030a	5.89 ± 0.024b	5.86 ± 0.031c	28.508***
72th hour / 72 sata	6.00 ± 0.030a	5.98 ± 0.027b	6.02 ± 0.044a	11.691***

***: P<0.001

ns: P>0.05

Table 2. Meat colour measurement with Minolta /
Tabela 2. Merenje boje mesa koristeći Minoltu

Groups Parameters / Grupe Parametri	K (n=30) $\bar{x} \pm s$	HS (n=30) $\bar{x} \pm s$	B (n=30) $\bar{x} \pm s$	F-value / F-vrednost
L	64.17 ± 2.283a	43.93 ± 2.601c	49.02 ± 4.189b	112.659***
a	16.13 ± 1.169c	18.56 ± 1.077b	21.27 ± 3.041a	16.838***
b	14.53 ± 1.211a	8.92 ± 1.196c	12.72 ± 2.418b	28.142***

***: P<0.001

Table 3. Water holding capacity – WHC measurement /
Tabela 3. Kapacitet zadržavanja vode – merenje WHC

Groups Parameters / Grupe Parametri	K (n=30) $\bar{x} \pm s$	HS (n=30) $\bar{x} \pm s$	B (n=30) $\bar{x} \pm s$	F-value / F-vrednost
24th hour (%) / 24. sat (%)	14.10 ± 0.241a	13.83 ± 0.233b	13.80 ± 0.174b	16.685***
5th day (%) / 5. dan	17.27 ± 0.264	17.40 ± 0.285	17.41 ± 0.280	2.399ns
8th day (%) / 8. dan	20.46 ± 0.355b	23.50 ± 0.292a	23.57 ± 0.301a	939.434***
11th day (%) / 11. dan	23.67 ± 0.396a	17.06 ± 0.296b	17.01 ± 0.269b	4154.935***

***: P<0.001 ns: P>0.05

Table 4. Shear force measurement with Instron Texture Analyser (Newton) /
Tabela 4. Merenje mekoće mesa koristeći Instron instrument za analizu teksture (Newton)

Groups Parameters / Grupe Parametri	K (n=30) $\bar{x} \pm s$	HS (n=30) $\bar{x} \pm s$	B (n=30) $\bar{x} \pm s$	F-value / F-vrednost
MLD	1801.90 ± 304.942	1705 ± 374.585	1686.4 ± 422.729	0.280 ^{ns}

ns: P>0.05

pH / pH

The values of pH 45 were similar to those found by Paulick *et al.* [14]. During the first 72 hours post mortem except pH 0, pre-slaughter handling affects the decrease in pH (Table 1). However other studies in lambs [19] showed no significant differences in the pH 0, pH 45 and pH 24 with the stunning method. Head-only electrical stunning method had an effect on the final pH of the muscle. From 45 minutes onwards significant differences between the different pre-slaughter handling groups were found in pH values. In the control group the lowest value was reached at 24 hours post mortem. On the other hand in the other two groups the lowest value was reached at 18 hours post mortem. Our results agree with those of Vergara and Gallego [20] and Paulick *et al.* [14], pH decreases more rapidly, and ageing starts earlier. Petersen and Blackmore [15] found that the increased muscle activity in animals stunned electrically is probably responsible for their more rapid post-mortem pH decline.

Meat colour / Boja mesa

Meat of the non stunned lambs was brighter (higher L* values) than that of electrically stunned groups and the difference between the groups was significant statistically. Also pre slaughter handling affected a* and b* values (Table 2). In similar, studies on domestic birds show that electrically stunned turkeys [5] and broilers [11] have redder meat (higher a* values) than those stunned with CO₂.

Water holding capacity / Kapacitet zadržavanja vode

Significant differences were found between the pre slaughter handling groups in WHC values except on days 5 (Table 3). In all groups (C, HO and HB), WHC decreased (more water expelled) with storage (14.10 ± 0.241 , 13.83 ± 0.233 and $13.80 \pm 0.174\%$ at 24 h post mortem to 20.46 ± 0.355 , 23.50 ± 0.292 , 23.57 ± 0.301 at 8 days post slaughter, for C, HO and HB, respectively). This agrees with the study of Koohmaraie, Whipple and Crouse [10], Moore and Young [12] and Vergara and Gallego [20]. In the C group the highest percentage of water expelled was at 11 days postmortem and 3 days earlier in the HO and HB groups. The tendency to release more water in the C group after 8 days post mortem suggests their initial juiciness could be greater.

Shear force / Mekoća mesa

The meat from stunned animals appeared more tender than that of the non-stunned animals, although the differences were not significant (Table 4). The differences in pH (Table 1) may be the cause of the higher values of shear force in meat of the non-stunned animals group, due to decreased activity of calpain [3]. Another study suggests the activity of calpain depends not only on the amount of

enzyme present, but also on the muscle pH [13]. Vergara and Gallego [20] did not find any differences between the stunned and non-stunned lamb meat shear force value.

Conclusion / Zaključak

The effect on meat quality was assessed in head-only electrically stunned, head-to-back electrically stunned and non-stunned lambs. Shear forces were not significantly different between treatments. However colour (L^*, a^*, b^*), WHC, muscle ultimate pH were found to be significantly higher ($P < 0.05$) between the groups. It is concluded that some of the meat quality parameters are affected by electrical stunning methods.

ACKNOWLEDGEMENT:

This work was supported by Research Fund of the Istanbul University. Project number T-80/23072002.

References / Literatura

1. Anil M. H., McKinstry J. L., Wotton S. B.: Electrical stunning and slaughter of pigs: Guidelines for good welfare assurance. *Fleischwirtschaft International*, 3, 8-13, 1997.
- 2. Devine C. E., Graafhuis A. E., Muir P. D., Chrystall B. B.: The effect of growth rate and ultimate pH on meat quality of lambs. *Meat Science*, 35, 63-77, 1993.
- 3. Dransfield E.: Modelling post-mortem tenderisation- V: Inactivation of calpains. *Meat Science*, 37, 391-409, 1994.
- 4. EU Council Directive 93/119. On the protection of animals at the time of slaughter or killing. Official Journal of European Community, 1340/21, 1993.
- 5. Fleming B. K., Froning G. W., Beck M. M., Sosnicki A. A.: The effect of carbon dioxide as a preslaughter stunning method for turkeys. *Poultry Science*, 70, 2201-2206, 1991.
- 6. Gilbert K. V., Devine C. E.: Effect of electrical stunning on petechial haemorrhages and on the blood pressure of lambs. *Meat Science*, 7, 197-207, 1982.
- 7. Gilbert K. V., Devine C. E., Hand R., Ellery S.: Electrical stunning and stillness of lambs. *Meat Science*, 11, 45-58, 1984.
- 8. Gregory N. G., Wotton S. B.: Sheep slaughtering procedures. I. Survey of abattoir practise. *British Veterinary Journal*, 140, 281-286, 1984.
- 9. Kirton A. H., Frazerhurst L. F., Woods E. G., Chrystall B. B.: Effect of Electrical Stunning Method and Cardiac Arrest on Bleeding Efficiency Residual Blood and Blood Splash in Lambs. *Meat Science*, 5, 347-353, 1981.
- 10. Koohmaraie M., Whipple G., Crouse J. D.: Acceleration of postmortem tenderization in lambs and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride. *Journal of Animal Science*, 68, 1278-1283, 1990.
- 11. Mohan Raj A. B., Grey T. C., Audsely A. R., Gregory N. G.: Effect of electrical and gaseous stunning on the carcass and meat quality of broilers. *Poultry Science*, 31, 725-733, 1990.
- 12. Moore V. J., Young O. A.: The Effects of Electrical Stimulation, Thawing, Ageing and Packaging on the Colour and Display Life of Lamb Chops. *Meat Science*, 30, 131-145, 1991.
- 13. Murachi T.: Calpain and calpastatin. *Trends Biochemistry Science*, 8, 167-169, 1983.
- 14. Paulick C., Stolle F. A., Von Mickwitz G.: Influence of different methods of stunning on meat quality of sheep. *Fleischwirtschaft*, 68, 3,

Vet. glasnik 61 (3-4) 155 - 162 (2007) S. K. Biyikinal and B. Nazli: Effect of different electrical stunning methods on meat quality of marmara kivircik breed lamb in Turkey...

264-271, 1988. - 15. Petersen G. V., Blackmore D. K.: The effect of different slaughter methods on the post mortem glycolysis of muscle in lambs. *New Zealand Veterinary Journal*, 30, 195-198, 1982. - 16. Petersen G. V., Carr D. H., Davies A. S., Pickett B. T.: The effect of different methods of electrical stunning of lambs on blood pressure and muscular activity. *Meat Science*, 16, 1-15, 1986. - 17. SPSS. *SPSS for Windows: advanced statistics release 9.0.1*. Chicago, USA:SPSS, 1999. - 18. Velarde A., Gispert M., Diestre A., Manteca X.: Effect of Electrical Stunning on Meat and Carcass Quality in Lambs. *Meat Science*, 63, 35-38, 2003. - 19. Vergara H., Gallego L.: Effect of type suckling and length of lactation period on carcasses and meat quality in intensive lamb production systems. *Meat Science*, 52, 2, 221-226, 1999. - 20. Vergara H., Gallego L.: Effect of electrical stunning on meat quality of lamb. *Meat Science*, 56, 345-349, 2000.

SRPSKI

EFEKTI RAZLIČITIH METODA ELEKTRIČNOG OMAMLJIVANJA NA KVALITET MESA KOD MARMARA KIVIRCİK JAGNJADI U TURSKOJ

S. K. Bujukunal, B. Nazli

Efekti metoda električnog omamljivanja samo glave poređeni su sa efektima električnog omamljivanja od glave do leđa. Izdvojeno je nasumično ukupno 90 jagnjadi Kivircik rase neposredno pre klanja radi sprovođenja jednog od tri vrste tretmana omamljivanja: kontrolna grupa (C), grupa gde je tretirana samo glava (HO; 1,0 A-AC za 3 s pri frekvenciji of 50 Hz), grupa tretmana od glave do leđa (HB; 1,0 A-AC za 3 s pri frekvenciji od 50 Hz) električnim omamljivanjem. Kvalitet mesa je ocenjen ispitivanjem pH, boje kao vrednosti L, a, b, kapacitet zadržavanja vode (WHC), i mekoće mesa.

Efekat na kvalitet mesa je procenjen kod jagnjadi koja su električno omamljena u predelu glave, u predelu od glave do leđa, i kod jagnjadi koja nisu omamljivana. Mekoća mesa se nije značajno razlikovala među tretmanima. Međutim, boja (L, a, b), kapacitet zadržavanja vode (WHC) i krajnji pH mišića su se razlikovali po grupama, odnosno bili su značajno viši ($p < 0,05$).

Ključne reči: jagnje, električno omamljivanje, kvalitet

ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ОБОЛЩЕНИЯ НА КАЧЕСТВО МЯСА У MARMARA KIVIRICIK ЯГНЯТ В ТУРЦИИ

S. K. Biyikinal, B. Nazli

Эффекты методов электрического оболщания только головы сранены с эффектами электрического оболщания от головы до спины. Нами выделено наобум совокупно 90 ягнят Kivircik породы непосредственно до убоя ради проведения одного из трёх видов лечения оболщания: контрольная группа (К), группа, где лечена только голова (НО; 1,0 А-АС за 3 с при частоте от 50 Hz) электрическим оболщанием. Качество мяса оценено испытанием pH, цвета в качестве стоимости L, a, b, мощность задержки воды (МЗВ), и мягкости мяса.

Эффект на качество мяса оценен у ягнят, электрически оболщённые в пределах головы, в пределах от головы до спины, и у ягнят, не оболщены. Мягкость мяса не значительно различалась между лечениями. Между тем, цвет (L, a, b), мощность задержки воды (МЗВ) и крайняя pH мышц различались по группах, то есть были значительно бóльшие ($p < 0,05$).

Ключевые слова: ягнёнок, электрическое оболщание, качество

**ZNAČAJ USTANOVLJAVANJA INTRAUTERINIH INFEKCIJA
VIRUSOM KLASIČNE KUGE SVINJA U SKLOPU PROGRAMA
SUZBIJANJA I ISKORENJIVANJA OBOLJENJA***
*SIGNIFICANCE OF DETERMINING INTRAUTERINE INFECTIONS
WITH CLASSICAL SWINE PLAGUE VIRUS WITHIN PROGRAMME
OF CURBING AND ERADICATING THIS DISEASE*

Jasna Prodanov, R. Došen, T. Petrović, Diana Lupulović, M. Valčić,
V. Polaček**

Ukoliko se suprasna nevakcinisana krmača inficira virusom klasične kuge svinja (KKS) dolazi do nastanka intrauterine infekcije fetusa. Posledica infekcije fetusa je pojava viremije. Distribucija virusa u njihovim tkivima je slična onoj koja se ustanovljava kod postnatalno inficiranih svinja. Cilj ispitivanja je bio ustanovljavanje intrauterine (transplacentarne) infekcije u slučaju pojave KKS u različitim periodima suprasnosti kod nevakcinisanih i vakcinisanih krmača. U okviru dva slučaja KKS kod neimunih suprasnih krmača materijal za ispitivanja je obuhvatao organe i tkiva fetusa. U trećem ispitivanom slučaju KKS, materijal je obuhvatao krv prasadi pre sisanja kolostruma, koja su bila poreklom od vakcinisanih krmača, na farmi gde je dijagnostikovana KKS. Uzorci tkiva i krvi prasadi su ispitivani na prisustvo antigena i specifičnih antitela protiv virusa KKS imunoenzimskom (ELISA) tehnikom. Iako su ispitivanja obavljena na malom broju uzoraka, dobijeni rezultati nameću pitanje mogućnosti nastanka intrauterine infekcije terenskim virusom KKS kod krmača vakcinisanih K-sojem virusa KKS. Sindrom krmačekliconoše i perzistentne infekcije su glavni otežavajući faktori koje je potrebno dodatno sagledavati u okviru programa suzbijanja i eradikacije KKS.

Ključne reči: klasična kuga svinja, intrauterina infekcija, eradikacija

* Rad primljen za štampu 4. 7. 2007. godine

** Mr Jasna Prodanov, istraživač saradnik, mr Radoslav Došen, istraživač saradnik, dr Tamaš Petrović, istraživač saradnik, mr Diana Lupulović, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"; dr Miroslav Valčić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr Vladimir Polaček, VSI Kraljevo

Uvod / Introduction

Ukoliko se suprasna nevakcinisana krmača inficira virusom klasične kuge svinja (KKS) dolazi do nastanka intrauterine (transplacentarne) infekcije fetusa [9, 11]. Posledica infekcije fetusa je pojava viremije. Smatra se da je distribucija ovog virusa u njihovim tkivima slična onoj koja se registruje kod postnatalno inficiranih svinja [6]. Međutim, iskustva istraživača u zemljama koje već više godina nastoje da iskorene KKS, ukazuju na sasvim drugačiju situaciju ukoliko se vakcinisane suprasne krmače izlože infekciji virusom KKS. Istraživanja obavljena u Meksiku pokazala su da je i pored primene propisanih programa za suzbijanje i iskorenjivanje, neophodna i kontinuirana kontrola farmi svinja vakcinisanih protiv KKS [3, 4]. Vakcinacija protiv KKS ne obezbeđuje zapt od infekcije, a razlog za to su različitosti imunološkog statusa brojnih kategorija svinja koje se mogu naći na farmi [5, 12]. Kod postnatalno inficiranih prasadi problem su jedinke različitog imunološkog statusa sa aspekta kolostralne zaštite [3, 10]. Sa druge strane, poseban značaj imaju transplacentarne infekcije krmača u različitim periodima suprasnosti. Kod inficiranih vakcinisanih suprasnih krmača postoji opasnost od nastanka intrauterine infekcije i prašenja inficirane, imunotolerantne prasadi kod kojih se registruju klinički znaci KKS tek u uzrastu od 1-2 meseca [12]. Na ovaj način, moguć je nastanak i održavanje endemske infekcije virusom KKS u vakcinisanom zapatu svinja [3, 4].

U literaturi nema mnogo podataka vezanih za proučavanje pojave i ishoda oboljenja nakon infekcije terenskim sojevima virusa KKS kod suprasnih krmača različitog imunološkog statusa. Cilj našeg ispitivanja je bio ustanovljavanje intrauterine (transplacentarne) infekcije u slučaju pojave KKS u različitim periodima suprasnosti kod nevakcinisanih i vakcinisanih krmača.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Materijal za ispitivanja je obuhvatao fetuse u okviru dva ispitivana slučaja, gde je na osnovu epizootiološke anamneze i kliničkih simptoma kod neimunih suprasnih krmača postavljena sumnja na KKS. Nakon patomorfološkog pregleda ukupno 14 plodova, od svakog su uzorkovana tkiva i organi: slezina, bubrež, tonzile i mandibularni limfni čvor. U trećem ispitivanom slučaju, materijal je obuhvatao krv uzorkovanu od 10 prasadi neposredno posle prašenja odnosno pre sisanja kolostruma, na farmi svinja gde je epizootiološki, klinički, patomorfološki i laboratorijski dijagnostikovana KKS. Uzorci tkiva i krvi prasadi su ispitivani na prisustvo antigena virusa KKS imunoenzimskom tehnikom (*ELISA*), dok su uzorci krvnih seruma prasadi ispitivani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS (*ELISA* tehnika).

Rezultati rada / Results

U okviru prvog ispitivanog slučaja, kliničkim i patomorfološkim pregledom nevakcinisane suprasne krmače koja je uginula pred prašenje, ustanovljene su promene karakteristične za KKS (letargija, krvarenja po koži, tačkasta krvarenja po bubrezima, hemoragični limfadenitis). Pregledom uterusa ustanovljeno je prisustvo 4 ploda u levom i 5 plodova u desnom rogu. U predelu perimetrijuma zabeležena su petehijalna krvarenja, naročito izražena u predelu desnog roga materice. Kod svih plodova ustanovljen je nalaz otoka potkožnog tkiva (pihtijasto-želatinozni edem u predelu vrata i podvilične regije), univerzalni limfadenitis, bubrezi sa izraženim subkapsularnim, difuznim krvarenjima u kori i meduli, otok perirenalnog tkiva, opsežna ekhimotična krvarenja po epikardu, visceralnom i parietalnom listu pleure i plućima, kao i izražena hiperemija moždanog tkiva. Kod pojedinih plodova ustanovljena su i tačkasta krvarenja po koži i potkožnom tkivu, dok je jedan plod u levom rogu bio delimično mumificiran.

Pregledom organa i tkiva krmače i plodova, u svim ispitanim uzorcima, ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS (ELISA tehnika). Međutim, pregledom pripadajućeg dela posteljice istih, prisustvo antigena virusa KKS nije utvrđeno u dva ispitana uzorka (tabela 1).

Tabela 1. Pregled tkiva i organa i pripadajućeg dela posteljice plodova na prisustvo antigena virusa KKS (ELISA tehnika) /

Table 1. Fetus tissue and organs and corresponding part of placenta examined for the presence of CSF viral antigen (ELISA)

Materica / Uterus	Broj ploda / Number of fetuses	Organi i tkiva / Organs and tissue	Deo posteljice / Part of placenta
Levi rog materice / Left horn of uterus	1	+	+
	2	+	+
	3	+	-
	4	mumifikacija / mummification	
Desni rog materice / Right horn of uterus	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	-

(+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz / (+) positive finding; (-) negative finding

U drugom posmatranom slučaju, materijal za ispitivanja su bila po bačena prasad poreklom od obolele krmače. Epizootiološkom analizom je ustanovljeno da krmača nije vakcinisana protiv KKS i da je u neposrednom okruženju dijagnostikovao primarni izvor infekcije. Klinički simptomi oboljenja koji su ustanovljeni kod krmače nisu bili karakteristični za KKS (blaga apatija, ležanje, slab

apetit). Neposredno nakon zapažanja inicijalnih znakova oboljenja kod iste krmače, usledio je pobačaj. Na osnovu analize evidencije o veštačkom osemenjavanju, ustanovljeno je da je pobačaj nastupio 35-40 dana suprasnosti. Patomorfološkim pregledom 6 pobačenih plodova ustanovljen je otok potkožja, petehijalna i ekhimotična krvarenja po koži u predelu trupa, perinealne regije i repa. Isto tako, krvarenja su ustanovljena i na pripadajućim delovima posteljice. Tri ploda su u momentu pregleda bila delimično macerirana. Pregledom organa ustanovljena su difuzna krvarenja po bubrezima, petehijalna krvarenja po endokardu i hemoragični limfadenitis. U svim ispitanim uzorcima tkiva plodova ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS (ELISA tehnika). Četiri dana nakon pobačaja, krmača je uginula i patomorfološkim pregledom ustanovljen je nalaz difuznih krvarenja na sluzokoži mokraćne bešike, univerzalni limfadenitis, a pregledom organa i tkiva ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS.

U okviru trećeg ispitivanog slučaja, KKS je registrovana na farmi svinja kapaciteta do 30 krmača. Epizootiološkom anamnezom je ustanovljeno da je oboljenje prisutno već oko 20 dana u objektu zalučene prasadi i javlja se kod jedinki uzrasta koji približno odgovara terminu kada se i obavlja zakonom propisana vakcinacija protiv KKS. Na osnovu ustanovljenih kliničkih simptoma i patomorfoloških promena postavljena je opravdana sumnja na KKS, što je i laboratorijski potvrđeno ustanovljavanjem antigena virusa KKS u organima i tkivima uginule zalučene prasadi (ELISA tehnika). Kod krmača koje su bile smeštene u objektu prasilišta i kod prasadi na sisi u momentu kada je dijagnostikovana KKS, kliničkim pregledom nisu ustanovljeni znaci bolesti. Pregledom evidencije na farmi ustanovljeno je da je u proteklom periodu obavljana povremena kontrola efikasnosti vakcinacije odnosno laboratorijski je potvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS u krvnim serumima krmača. Međutim, analizom podataka o vakcinaciji svake krmače, ustanovljeno je da su pojedine krmače vakcinisane Kina (K) sojem virusa KKS tokom suprasnosti. S obzirom na to da je odmah posle ustanovljavanja infekcije virusom KKS na farmi svinja sproveden program o suzbijanju oboljenja predviđen zakonom, samo kod dve krmače koje su bile neposredno pred prašenje obavljeno je uzorkovanje krvi iz pupčane vrpce prasadi (tabela 2). Na osnovu uvida u evidenciju o vakcinaciji krmača, ustanovljeno je da je krmača br. 14 vakcinisana 26. dana suprasnosti, dok je krmača br. 22 vakcinisana 24. dana suprasnosti. Isto tako, ustanovljeno je da su obe krmače još u uzrastu praseta dva puta vakcinisane protiv KKS i još jednom kao nazimice. Pregledom uzoraka krvi prasadi pre sisanja kolostruma, prisustvo antigena virusa je ustanovljeno u oba legla. Međutim, kod dva praseta krmače br. 14 isti nije ustanovljen. Pregledom krvnih seruma prasadi nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. Do trenutka kada je pristupljeno realizaciji neškodljivog uklanjanja zapata svinja (dva dana), kod krmača i kod prasadi na sisi poreklom iz dva laboratorijski ispitivana legla, nisu ustanovljeni klinički znaci KKS.

Tabela 2. Rezultati ispitivanja krvi prasadi pre sisanja kolostruma (ELISA tehnika)
Table 2. Results of examined blood of piglets before suckling colostrum (ELISA)

Oznaka krmače / Sow number	Oznaka praseta / Piglet number	Antigen virusa KKS / CSF viral antigen	Antitelaprotiv virusa KKS / Antibodies against CSF virus
br. 22	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
br. 14	1	-	-
	2	+	-
	3	-	-
	4	+	-
	5	+	-

(+) pozitivan nalaz; (-) negativan nalaz / (+) positive finding; (-) negative finding

Diskusija / Discussion

Intrauterine infekcije virusom KKS mogu dovesti do različitih posledica među kojima se najčešće navode: pobačaji, mumifikacija plodova, prašenje mrtve, avitalne i prasadi sa kongenitalnim tremorom, prašenje na izgled zdrave, ali perzistentno inficirane prasadi i prasadi kod kojih se mogu ustanoviti i antitela protiv virusa KKS [9, 11]. Ishod transplacentarne infekcije zavisi od stadijuma gestacije i virulencije virusa koji je izazvao infekciju [2, 6]. U okviru prvog ispitivanog slučaja, ustanovljene patomorfološke promene na uterusu i plodovima su u saglasnosti sa promenama opisanim u literaturi: generalizovan subkutani edem i prisustvo velike količine tečnosti u telesnim šupljinama-ascites, hidrotoraks, petehijalna krvarenja na koži i organima [7, 8]. Smatra se da ukoliko transplacentarna infekcija nastupi u zadnjoj trećini gestacije, prasad uginjavaju *in utero* [2]. Dobijeni rezultati ispitivanja potvrđuju stanovište drugih autora [6, 11] da je distribucija i ustanovljavanje virusa KKS u tkivima *in utero* inficirane prasadi slična distribuciji antigena u tkivima i organima svinja postnatalno inficiranih virusom KKS. Međutim, smatra se da ne nastaje infekcija svih fetusa istovremeno, pri čemu se procenat fetusa koji imunološki mogu da odreaguju na virus uvećava kako se povećava stadijumom suprasnosti u kom se odigrala infekcija, što se može povezati sa maturacijom imunog sistema [2, 8]. Infekcija virusom KKS se širi preko epiteliohorijalne placente, zahvata jedan ili više fetusa, sa posledičnim širenjem virusa na susedne plodove [6]. U okviru naših ispitivanja, iako je antigen virusa KKS ustanovljen u svim plodovima, isti nije ustanovljen u delovima posteljice dva ploda. Smatra se da što se infekcija odigra kasnije tokom suprasnosti, veći je broj neinficirane prasadi u okviru inficiranih legala [8], ali u literaturi nema dostupnih podataka koji se odnose na ispitivanje placente inficiranih plodova. Činjenica da fetusi koji se na-

laze u isto vreme zajedno u uterusu, mogu biti selektivno inficirani, predstavlja još jednu od osobitosti infekcije virusom KKS [2].

U drugom ispitivanom slučaju, iako klinički znaci kod krmače nisu sa sigurnošću ukazivali na infekciju virusom KKS, na osnovu epizootioloških podataka i patomorfoloških promena kod pobačenih plodova opravdano je postavljena sumnja. Smatra se da prenatalno, u ranoj fazi ontogeneze, virus KKS utiče na diferencijaciju organa i dovodi do nastanka malformacija, pa infekcije nastale tokom rane suprasnosti, nose veći rizik od nastanka teratogenih efekata [6, 10]. Malformacije uključuju deformitete različitih delova tela (glave, rila, udova i repa) i organa (bubrega, jetre), kao i centralnog nervnog sistema (mikrocefalus, hidrocefalus, cerebelarna hipoplazija) [6, 7]. U okviru naših ispitivanja makroskopskim pregledom nisu ustanovljeni deformiteti, već samo maceracija pojedinih plodova. S obzirom na to da je krmača pobacila 35-40. dana suprasnosti i da je u svim ispitivanim uzorcima tkiva i organa plodova ustanovljen antigen virusa KKS, može se postaviti pitanje dužine vremenskog perioda koji je protekao od infekcije krmače do infekcije njenih plodova. Frey i sar. [1] smatraju da u slučaju infekcije slabo ili srednje virulentnim virusom KKS, infekcija fetusa nastaje u periodu od 13-18. dana nakon infekcije krmače. Fetusi koji su inficirani tokom prvih 45 dana suprasnosti pokazuju veće sklonosti ka prenatalnom uginuću, što se klinički manifestuje abortusom [2, 6]. Ukoliko se prihvati ovakav način proračuna, može se pretpostaviti da je infekcija krmače nastupila oko 22-25. dana suprasnosti.

Svakako da je sa aspekta suzbijanja i iskorenjivanja KKS, najznačajniji treći ispitivani slučaj, gde je ustanovljeno prašenje kongenitalno inficirane prasadi, bez kliničkih znakova oboljenja. Malo je podataka u literaturi koji se odnose na proučavanje sigurnosti i efikasnosti modifikovanih živih vakcina protiv virusa KKS kada se on aplikuje tokom graviditeta ali nisu ustanovljeni neželjeni efekti usled prenošenja vakcinalnog virusa na fetuse [10, 11]. Pretpostavlja se da K-soj sprečava nastanak intrauterinih infekcija jer u organizmu vakcinisane jedinke skoro u potpunosti prevenira replikaciju virusa KKS [9, 10]. Ispitivane krmače, u momentu kada je KKS dijagnostikovana na farmi, nisu pokazivale kliničke znakove oboljenja. Uprkos činjenici da su krmače bile vakcinisane, u ispitivanim uzorcima krvi prasadi u oba legla ustanovljeno je prisustvo antigena virusa KKS u krvi. Ističe se i nalaz da kod ispitivanih prasadi nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela u serumu pre sisanja kolostruma. To nam može ukazivati da je od momenta infekcije proteklo manje od 20 dana [8].

Kod prasadi inficirane *in utero* sa terenskim sojevima virusa različite virulentnosti, može se razviti perzistentna infekcija koja se nakon prašenja karakteriše viremijom, kasnom pojavom bolesti, uginućem u uzrastu od 2-11 meseci i specifičnom tolerancijom imunog sistema za virus KKS [6, 8]. Što infekcija nastupi u ranijoj fazi gestacije, to je veći broj ustanovljenih perzistentnih infekcija kod prasadi [2]. Nakon prašenja, iz organizma perzistentno inficirane prasadi, virus se kontinuirano izlučuje što omogućava da se infekcija dalje širi na prijemčive jedinke [2, 8]. Smatra se da maturacija imunog sistema igra važnu ulogu u pato-

genezi nastanka perzistentnih infekcija, jer virus KKS ima afinitet za ćelije imunog sistema, što može rezultirati u nastanku alteracija imunološke reaktivnosti [2]. Imuni sistem fetusa svinje stiče sposobnost prepoznavanja antigena virusa KKS između 60. i 75. dana gestacije, ali su perzistentne infekcije uspešno izazvane i pre i nakon razvoja imunokompetentnosti [8]. Međutim, ukoliko nastupi intrauterina infekcija, neutralizaciona antitela protiv KKS se sintetišu samo u terminalnoj fazi fetalnog razvoja [9]. Kongenitalno inficirana prasada su klinički prividno zdrava [8], imunotolerantna i mogu živeti duži vremenski period bez razvoja imunog odgovora [6] pri čemu izlučuju virus u okolinu sve do trenutka kada nastane tzv. kasna pojava bolesti ("*late onset*"). Ona se karakteriše konjunktivitisom, anoreksijom, febrom, dermatitisom, dijarejom, lokomotornim poremećajima i posteriornom parezom [2, 8]. Faktori koji dovode do "okidanja" i pojave kliničkih znakova nakon dugog inkubacionog perioda nisu poznati [7, 8]. Ustanovljeni fenomen se naziva sindrom krmače-kliconoše ("*carrier sow-syndrome*") [9] i od velikog je značaja u epizootologiji KKS, jer može biti uzrok perzistentnog održavanja žarišta infekcije. U regionima gde je KKS endemski prisutna postoji opasnost da se inficirana zalučena prasada transportuju na druge farme gde mogu biti uzrok pojave izbijanja novog žarišta oboljenja. Rezultati epizootioloških ispitivanja koja su vršena u Holandiji, ukazuju na to da su kod vakcinisanih krmača kongenitalne infekcije predstavljale problem i bile su uzrok daljeg širenja KKS još 4 meseca nakon što je obavljena vakcinacija priplodnih jedinki K-sojem [12]. Postojanje slabo do srednje virulentnih sojeva virusa, sindrom krmače-kliconoše i perzistentne infekcije su glavni otežavajući faktori koje je potrebno dodatno sagledavati u okviru programa suzbijanja i eradikacije KKS [4, 8].

Zaključak / Conclusion

Iako su ispitivanja obavljena na malom broju uzoraka, nameće se pitanje mogućnosti nastanka intrauterine infekcije terenskim virusom kod krmača vakcinisanih K-sojem virusa KKS. Dobijene rezultate je svakako neophodno proveriti i ispitati u eksperimentalnim uslovima infekcije, jer kada su u pitanju terenska ispitivanja, u tumačenju rezultata ne mogu biti isključeni brojni potencijalni faktori koji utiču na pojavu grešaka pri vakcinaciji. Sa epizootiološke tačke gledišta, najnepovoljniji ishod intrauterine infekcije je nastanak sindroma krmače-kliconoše i prašenje perzistentno inficirane, na izgled zdrave prasadi koja kontinuirano izlučuje virus. U ovakvim slučajevima ključni faktor u eradikaciji je rano otkrivanje kliconoša.

Literatura / References

1. Frey H. R., Liess B., Richter-Reichhelm H. B., Bente K., Trautwein G.: Experimental Transplacental Transmission of Hog Cholera Virus in Pigs. I. Virological and Serological Studies. Zbl. Vet. Med. B, 27, 154-164, 1980. - 2. Liess B.: Persistent infections of hog cholera: a review. Preventive Veterinary Medicine, 2, 109-113, 1984. - 3. Morilla A., Car-

vajal M. A.: Experiences with Classical Swine Fever Vaccination in Mexico. In: Morilla A., Yoon K. Y., Zimmerman J.J., eds. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Ames, Iowa State Press, 162-163, 2002. - 4. Morilla A., Rosales C.: Reemergence of classical swine fever virus in Mexico. In: Morilla A., Yoon K.Y., Zimmerman J.J., eds. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Ames, Iowa State Press, 149-152, 2002. - 5. Prodanov J., Došen R., Valčić M., Polaček V., Petrović T., Lazić S.: Ispitivanje uticaja kolostralnih antitela na razvoj patomorfoloških promena posle eksperimentalne infekcije prasadi virusom klasične kuge svinja. Vet. Glasnik 60, 5-6, 323-335, 2006. - 6. Terpstra C.: Hog Cholera: An update of present knowledge. Br. vet. J. 147, 397-406, 1991. - 7. Trautwein G.: Pathology and pathogenesis of the disease. In: Classical Swine Fever and Related Viral Infections. Ed: Liess, B. Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, 27- 49, 1988. - 8. van Oirschot J. T.: Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence. Their effects on the immune system. Ph.D. Thesis. Universiteit Utrecht, 5-30, 1980. - 9. van Oirschot J. T.: Classical swine fever. In Diseases of Swine, Ed: Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor, D. J., Ames, Iowa State University Press, 159-172, 1999. - 10. van Oirschot J. T.: Vaccinology of swine fever: from lab to field. Vet. Microbiol. 96, 367-384, 2003. - 11. van Oirschot J. T., Terpstra C.: Hog Cholera Virus. In: Virus infections of porcines. M. B. Pensaert, ed.; New York, Elsevier Science Publishers, 113-130, 1989. - 12. Terpstra C., Robijns K. G.: Experience with regional vaccination against swine fever in enzootic areas for limited periods using C-strain virus. Tijds. Diergeneesk. 102, 106-112, 1977.

ENGLISH

SIGNIFICANCE OF DETERMINING INTRAUTERINE INFECTIONS WITH CLASSICAL SWINE PLAGUE VIRUS WITHIN PROGRAMME OF CURBING AND ERADICATING THIS DISEASE

Jasna Prodanov, R. Došen, T. Petrović, Diana Lupulović, M. Valčić, V. Polaček

Intrauterine infection of the fetus occurs if a pregnant non-vaccinated sow is infected with the virus of classical swine plague (CSF). The infection of the fetus results in the occurrence of viremia and the distribution of the virus in fetal tissue is similar to the distribution which is established in post-natally infected swine. The objective of these investigations was to determine intrauterine (transplacental) infection in the event of the appearance of CSF in different periods of pregnancy in non-vaccinated and vaccinated sows. The examined material were organs and tissue of fetuses within two examined cases of CSF in non-immune pregnant sows. In the third examined case of CSF, the material comprised the blood of piglets before suckling the colostrum, animals originating from vaccinated sows, at a farm in which CSF had been diagnosed. Samples of tissue and blood of the piglets were examined for the presence of antigens and specific antibodies against the CSF virus using the immunoenzyme technique (ELISA). Even though the investigations were performed on a small number of samples, the obtained results raise the question of the possibility of the occurrence of intrauterine infection with a CSF field virus in sows vaccinated with the C-strain of CSF. The syndrome of a carrier sow and persistent infections are the chief problem factors that need to be considered within the programme of curbing and eradicating classical swine plague.

Key words: classical swine plague, intrauterine infection, eradication

ЗНАЧЕНИЕ УСТАНОВЛИВАНИЯ ВНУТРИМАТОЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВИРУСОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В СОСТАВЕ ПРОГРАММЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ И ИСКОРЕНЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ясна Проданов, Р. Дошен, Т. Петрович, Дияна Лупулович, М. Валчич, В. Полачек

Насколько супоросная невакцинированная свиноматка инфицируется вирусом классической чумы свиней (КЧС) приходит до возникновения внутриматочной инфекции плода. Последствие инфекции плода явление виремии и дистрибуции вируса в их тканях подобна дистрибуции, устанавливаемая у постнатально инфицированных свиней. Цель испытания была установление внутриматочной (трансплацентарной) инфекции в случае явления КЧС в различных периодах супоросности у невакцинированных и вакцинированных свиноматок. Материал для испытания охватывал органы и ткани плода в рамках два испытываних случая КЧС у неиммунных супоросных свиноматок. В третьем испытыванном случае КЧС, материал охватывал кровь поросят до сосания колострума, которые были происхождением от вакцинированных свиноматок, на ферме, где диагностирована КЧС. Образчики тканей и крови поросят испытываны на присутствие антигенов и специфических антител против вируса КЧС иммуноэнзимной (*ELISA*) техникой. Хотя испытания сделаны на маленьком числе образчиков, осуществлённые результаты испытания накладывают вопрос возможности возникновения внутриматочной инфекции вирусом местности КЧС у свиноматок вакцинированных К-штамом вируса КЧС. Синдром свиноматки-баццилоносителя и персистентной инфекции главные затрудняющие факторы, которые надо дополнительно замечать в рамках программы преодоления и искоренения КЧС.

Ключевые слова: классическая чума свиней, внутриматочная инфекция, искоренение

OSNOVNI PRINCIPI ZAŠTITE DOBROBITI OGLEDNIH
ŽIVOTINJA*
*BASIC PRINCIPLES OF EXPERIMENTAL ANIMALS WELFARE
PROTECTION*

Marijana Vučinić**

Etička načela zaštite dobrobiti oglednih životinja iz podtipa kičmenjaka nalažu da se njihova upotreba svede na najmanju moguću meru, ne samo iz etičkih, već i iz praktičnih razloga. Ogledi na kičmenjacima mogu da se sprovode samo ako ne postoje odgovarajući alternativni modeli i ako patnja životinja koje se koriste u ogledima može da se opravda koristima samog in vivo ogleda. U ovom radu, revijalnog karaktera, izneti su osnovni etički principi korišćenja oglednih životinja. Ti principi su: "3R pravilo", "pravilo 5 sloboda" i "Solna pravilo". Takozvano "3R pravilo" odnosi se na zamenu oglednih životinja iz podtipa kičmenjaka alternativnim životinjskim modelima na nižem stupnju evolutivnog razvoja, biljnim vrstama, životinjskim i biljnim kulturama ćelija i tkiva, izolovanim organima, fizičkim, mehaničkim, hemijskim modelima, kompjuterskim simulacijama, smanjenje broja životinja u ogledu i usavršavanje ogledne procedure do stepena na kojem je moguće potpuno izbeći ili umanjiti neprijatna telesna i emocionalna iskustva životinja u ogledu. "Solna pravilo" se odnosi na procenu biološke pogodnosti, ponovljivosti i prihvatljivosti in vivo ogleda i alternativnih animalnih modela.

Ključne reči: ogledne životinje, dobrobit, zaštita, 3R pravilo, pet sloboda, Solna principi

Uvod / Introduction

Pod zaštitom životinja podrazumevaju se sve aktivnosti čoveka kojima se štiti fizički, psihički i genetički integritet životinja. Pojam dobrobit ukazuje na stepen do kojeg su uslovi života u kojima čovek gaji i pod kojima iskorišćava živo-

* Rad primljen za štampu 29. 11. 2007. godine

** Dr Marijana Vučinić, vanredni profesor, Katedra za zoohigijenu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

tinje prilagođeni njihovim potrebama [1]. Jedna od upotrebnih kategorija, čija dobrobit zavisi isključivo od čoveka, jesu i ogledne životinje.

Izračunato je da se svake godine u svetu iskoristi od 75 do 100 miliona oglednih životinja u fundamentalnim, primenjenim istraživanjima, obrazovanju i testiranju različitih proizvoda. Samo u evropskim zemljama, broj oglednih životinja koji se iskoristi svake godine u iste svrhe dostiže cifru od 10,7 miliona. Najveći broj oglednih životinja pripada podtipu kičmenjaka i koristi se u farmaceutskoj industriji za razvoj novih lekova (23%) i ispitivanje vakcina i drugih bioloških preparata (21%). Oko 12% oglednih životinja, koje pripadaju podtipu kičmenjaka, iskoristi se svake godine za proučavanje malignih oboljenja, oko 9% u testovima toksičnosti, 2% u ispitivanjima kardiovaskularnog sistema, 1% u obrazovne svrhe i 32% u sve druge svrhe. Od svih vrsta koje pripadaju podtipu kičmenjaka najviše se koriste različiti laboratorijski sojevi miševa (44%) i pacova (33%), ptice (10%), ribe (7%), zamorci (2%), kunići (1%), dok udeo svih ostalih vrsta kičmenjaka iznosi oko 3% [2, 3]. Ciljevi svih delatnosti u kojima se iskorišćavaju ogledne životinje su unapređenje zdravlja i dobrobiti čoveka, unapređenje zdravlja, dobrobiti i proizvodnih rezultata domaćih životinja, pronalaženje boljih i efikasnijih načina zaštite divljih životinja, posebno ugroženih vrsta, ekološka zaštita, pronalaženje mnogo humanijih i efikasnijih načina kontrole štetnih organizama, provera efikasnosti i kontrole kvaliteta novosintetisanih i već postojećih hemijskih jedinjenja, koja se koriste u različite svrhe, kao i sticanje novih saznanja iz različitih oblasti biologije, humane medicine, veterinarske medicine, hemije, poljoprivrede i sl. Biomedicinska istraživanja se obavljaju na različitim životinjama: armadilosima (proizvodnja vakcine za lepru), mačkama (proučavanje AIDS-a, oboljenja oka i uha i nervnog sistema), činčilama (oboljenja srednjeg uha i gubitak sluha), psima (hirurški zahvati na srcu, hirurški zahvati u ortopediji, operacije kuka i drugih zglobova), lasicama (virusne bolesti kao što je influenza), ribama (vid, maligna oboljenja jetre, bakterijske bolesti, termoregulacija, tumori kože), rakovima (poremećaji motorne koordinacije koje nastaju kod Parkinsonove bolesti ili sifilisa), zamorcima (deficit vitamina C), miševima (kancer, procesi starenja, AIDS, imunološka i genetička istraživanja, embriotransfer), nečovekolikim primatima (kardiološki poremećaji, neurološki poremećaji, malarija, lečenje imunoloških poremećaja, podudarnost Rh faktora, meningitis), golubovima (bolesti srca), svinjama (tretman opekotina, zamenjena srčanih valvula), kunićima (transplantacija rožnjače, efikasnost lekova koji snižavaju nivo holesterola, sprečavanje razvoja ateroskleroze), pacovima (načini lečenja paralize nastale usled oštećenja nerava različite etiologije, testovi efikasnosti i kontrole kvaliteta lekova, uticaj ishrane na proces starenja, proučavanje mehanizama odbacivanja tkivnih transplantata), ovcama (proučavanje efikasnosti opreme koja pomaže uspostavljanju funkcije respiratornih organa novorođenčadi, proučavanje razvoja ateroventoznog šanta), puževima golaćima (proučavanje kratkotrajne i dugotrajne memorije) i dr. Danas postoji posebna multidisciplinarna naučna grana, koja se zove nauka o oglednim životinjama [3]. Ova nauka ima dva cilja. Prvi je usavršavanje kvaliteta ogleđa na životinjama. Drugi je zaštita dobrobiti

oglednih životinja. U ovoj nauci se koriste znanja o biološkim osobinama oglednih životinja, uslovima smeštaja za ogledne životinje, genetičkoj i mikrobiološkoj nomenklaturi, podeli i standardizaciji oglednih životinja, preventivi i tretmanu bolesti oglednih životinja, eksperimentalnim procedurama, anesteziji, analgeziji, eutanaziji, alternativnim eksperimentalnim procedurama i etičkim osnovama rada sa oglednim životinjama. Smatra se da svi kičmenjaci poseduju osećaje slične čoveku, a potvrđeno je da su im neprijatni emocionalni i telesni osećaji i stanja, kao što su bol, patnja, dosada, strah i stres zajedničke karakteristike [1]. Zato postoje osnovna načela zaštite oglednih životinja, a to su takozvano "3R" pravilo [4] i pravilo "5 sloboda" [5] o kojima je reč u ovom radu.

"3R" pravilo – Zamena i smanjenje broja životinja u ogledima i usavršavanje ogledne procedure / "Three Rs" - Replacement, reduction, refinement welfare protection

Takozvano "3R" pravilo predstavlja osnovu zaštite dobrobiti oglednih životinja. Predložili su ga još 1959. godine Russell i Burch [4] u svojoj knjizi "Principi humane eksperimentalne tehnike". Skraćenica, 3R, potiče od engleskih reči *replacement* – zamena, *reduction* – smanjenje i *refinement* – usavršavanje.

Princip zamene podrazumeva zamenu *in vivo* ogleda na vertebratima *in vivo* ogledima na invertebratima i *in vitro* ogledima. Ovaj princip nalaže da ogledi na životinjama iz podtipa kičmenjaka mogu da se izvode samo ako ne postoje alternativne metode i ako patnja životinja u ogledu može da se opravda koristeći *in vivo* ogleda. Alternative *in vivo* ogledima su ogledi na životinjskim vrstama na nižem stupnju filogenetskog razvoja (invertebrati), uglavnom na glistama, insektima i mikroorganizmima, izolovanim organima, kulturama tkiva i ćelija animalnog i biljnog porekla, ogledi na biljnim vrstama, kompjuterske simulacije i upotreba različitih hemijskih, fizičkih i mehaničkih modela [6, 7].

Princip smanjenja broja životinja u ogledima, prvenstveno se postiže primenom principa zamene, a potom korišćenjem najkvalitetnijih oglednih životinja, ako je njihova upotreba neminovna, standardizacijom genotipa i mikrobiološkog statusa oglednih životinja, standardizacijom ogledne procedure, primenom najpogodnijih statističkih metoda za obradu rezultata ogleda i za testiranje tačnosti naučne hipoteze [8] i korišćenjem istih životinja više puta u različitim ogledima, odnosno izbegavanjem ogleda koji se okončavaju žrtvovanjem životinja. Ovo znači da je nepotrebno izvoditi više puta isti ogled u svrhu potvrde njegove ponovljivosti, kao što je i nepotrebno obavljati istraživanja na životinjama za čije rezultate ne može da se uradi ekstrapolacija na čoveku. Sa druge strane, potrebno je razvijati nove *ex vivo* i *in vitro* istraživačke metode, povećavati biotehnički kvalitet ogleda i usmeriti rad ka dobijanju mnogo relevantnijih rezultata na manjem broju oglednih životinja.

Princip usavršavanja ogledne procedure podrazumeva izvođenje ogleda na životinjama na način kojim se do najveće mere smanjuje patnja životinja, a postiže se primenom principa "5 sloboda" [9].

Primena principa "5 sloboda" u zaštiti dobrobiti oglednih životinja / *Five freedoms in experimental animals welfare protection*

Princip "5 sloboda" [9, 10, 11, 12, 13] nalaže da se svakoj životinji u eksperimentu obezbedi:

- sloboda od gladi i žeđi, obezbeđivanjem dovoljne količine kvalitetne hrane i vode, osim u slučaju kada je oglednom procedurom kontraindikovano, ali ne u periodu koji može da ugrozi dobrobit usled gladi i žeđi,
- sloboda od neudobnosti, obezbeđivanjem kvalitetnog smeštajnog prostora koji pruža osećaj fizičke i termičke udobnosti i osećaj sigurnosti,
- sloboda od bola, bolesti i povreda, primenom odgovarajućih preventivnih, profilaktičkih i kurativnih tretmana,
- sloboda od neprijatnih emocionalnih iskustava i stanja kao što su strah, dosada, patnja i stres, primenom odgovarajućih medikamenata koji životinju oslobađaju neprijatnih telesnih i emocionalnih iskustava i
- sloboda ispoljavanja prirodnih oblika ponašanja i ostvarivanja socijalnog kontakta sa životinjama iste vrste, obogaćivanjem smeštajnog prostora strukturnim, socijalnim, auditornim, vizuelnim, taktilnim, olfaktornim i drugim stimulusima.

Solna principi / *Solna principles*

Da bi se ispoštovala navedena pravila, od naučnih radnika koji obavljaju ogledne na životinjama zahteva se odgovornost, koja se obično nadovezuje na "3R" pravilo (*responsibility*, eng. = odgovornost), te ono dobija oblik "4R" pravila. Pored toga, radi stimulisanja naučnika na korišćenje alternativnih modela u istraživanjima, testiranjima i u obrazovanju, osmišljeno je i drugo "3R pravilo", takozvano "Solna pravilo" [14]. Ovo pravilo se odnosi na minimum zahteva koje alternativne metode treba da ispune za *in vivo* ogledne i njegova skraćnica takođe potiče od engleskih reči: *relevance* – biološka prikladnost (odnosi se na biološku relevantnost *in vitro* ogleda u odnosu na *in vivo* ogled), *reliability* – pouzdanost (odnosi se na biološku pouzdanost *in vitro* ogleda u odnosu na *in vivo* ogledne, odnosno na ponovljivost ogleda i rezultata u različitim uslovima izvođenja i između različitih oglednih institucija) i *regulatory acceptability* – regularnost prihvatljivosti (odnosi se na realnu pogodnost *in vitro* testa za određenu vrstu istraživanja). Istim pravilom može da se tumači i biološka prikladnost, pouzdanost i regularnost *in vivo* ogleda na određenim animalnim modelima ukoliko ne postoje odgovarajuće alternative.

Kategorije invazivnosti ogleda na životinjama / *Categories of invasiveness in animal experiments*

Zaštiti dobrobiti oglednih životinja doprinose i stroge regulative sadržane u zakonima o dobrobiti životinja i zakonskim aktima koji se odnose na naučne i obrazovne delatnosti. U većini evropskih zemalja, u kojima postoje zakoni o dobrobiti životinja, posebno poglavlje zakona posvećeno je i zaštiti oglednih kičmenjaka koji se koriste u naučne i obrazovne svrhe i za testiranje različitih proizvoda. Ovaj deo zakona obavezuje potencijalnog korisnika oglednih životinja da etičkom komitetu, koji se osniva na institucionalnom, regionalnom i nacionalnom nivou, preda zahtev za izdavanje odobrenja za korišćenje oglednih životinja iz podtipa kičmenjaka. Preduslov je da osoba koja traži odobrenje za ogled, poseduje dozvolu za rad sa oglednim životinjama, koja se stiče pohađanjem stručnih kurseva a obnavlja se svake godine ili svake treće godine kroz kontinuiranu edukaciju o oglednim životinjama [15]. Zahtev za izdavanje dozvole za korišćenje oglednih životinja treba da sadrži sledeće informacije: cilj i relevantnost ogleda, kompetentnost i iskustvo istraživača ili edukatora i ostalog osoblja koje učestvuje u radu sa oglednim životinjama, obrazloženje zašto se ne koriste alternativne metode već se ogled izvodi na kičmenjacima, obrazloženje razloga zašto su za ogled izabrane baš one vrste životinja za koje se traži dozvola za rad, poreklo oglednih životinja, odnosno izvori njihove nabavke, uslovi smeštaja, nege, ishrane i napajanja životinja u toku ogleda i po završetku ogleda, detaljan opis ogledne procedure (vrsta ogleda, učestalost tretmana životinja u ogledu i trajanje ogledne procedure), pretpostavljeni nivo neprijatnosti ogledne procedure za životinje, upotreba analgetika i anestetika u ogledu ili drugih metoda i sredstava radi smanjenja stepena neprijatnih emocionalnih i telesnih iskustava (bol, strah, stres, patnja i sl.), brzina oporavka životinja posle ogleda i mogućnost korišćenja istih životinja u ogledima iste ili druge vrste, obrazloženje da li je i zašto je potrebno humano žrtvovanje životinja (kada i kako) i kategorija invazivnosti ogleda na životinjama. U zavisnosti od stepena narušavanja fizičkog, psihičkog ili genetičkog integriteta životinja, ogledi na životinjama svrstani su u sledećih 5 kategorija invazivnosti [16]:

– "A" - ogledi na neživom materijalu, živim izolatima (ćelijske i tkivne kulture) i na invertebratima.

– "B" - ogledi na životinjama koji ne prouzrokuju osećaj nelagodnosti kod životinja ili je ovaj osećaj slabog intenziteta. Primeri ovog stepena invazivnosti su eksperimenti na invertebratima sa kompleksnim nervnim sistemom, istraživanja na kratkotrajno i vešto obuzdanim životinjama radi posmatranja i fizičkog ispitivanja (proučavanje eksterijera, stanja uhranjenosti, morfološkog sklopa i sl.), intravenska, potkožna, intramuskularna, intraperitonealna, peroralna, intratorakalna i intrakardijalna (kategorija "C") aplikacija netoksičnih materija, akutna istraživanja na potpuno anestetiziranim životinjama koje se na kraju ogleda žrtvuju eutanazijom, a u toku ogleda ne mogu doći svesti, tj. proučavanje trenutne

smrti, demonstriranje metoda eutanazije posle brzog uvođenja u besvesno stanje, kao što je predoziranje anestetika ili dekapitacija posle sedacije ili lake anestezije i ogledi koji se zasnivaju na kratkotrajnom gladovanju i žednovanju životinja u vremenu koje odgovara dužini apstinencije u prirodnim uslovima.

– "C" - eksperimenti koji prouzrokuju minimalni stepen stresa ili bola ili samo kratkotrajni bol. U ovu kategoriju spadaju istraživanja na kičmenjacima zasnovana na kanulaciji ili kateterizaciji krvnih sudova ili telesnih duplji pod anestezijom, male hirurške intervencije pod anestezijom, biopsija, laparoskopija, kratkotrajno obuzdavanje radi jednostavne opservacije ili druge vrste ispitivanja, ali koje su povezane sa minimalnim stresom, kratkotrajni period uskraćivanja hrane i vode, ali koji prevazilazi period prirodne apstinencije, eksperimenti radi proučavanja ponašanja na svesnim životinjama koje su kratkotrajno obuzdane tako da je kod njih prouzrokovan minimalan stepen stresa ili su obuzdane primenom neprijatnih stimulusa. Posle završenih oglednih procedura "C" kategorije kod životinja ne sme da se ispolje znaci anoreksije, dehidracije, hiperaktivnost, somnolentnost, povećana potreba da leže, intenzivna vokalizacija, pojačana agresivnost, autoizolacija, antisocijalno ponašanje ili automutilacija.

– "D" - eksperimenti koji prouzrokuju značajan stepen bola kod kičmenjaka. Primeri za to su istraživanja na kičmenjacima koja se zasnivaju na hirurškim intervencijama pod opštom anestezijom, posle kojih je moguć potpun oporavak, indukcija fizioloških ili morfoloških anomalija koje za posledicu imaju bol ili stres, izlaganje životinje neprijatnim stimulusima čije je izbegavanje nemoguće, prolongirano fizičko obuzdavanje u trajanju od više časova, indukcija promena u ponašanju, koje dovode do stresa, kao što su odvajanje mladunčadi od majke, agresivnost, izlaganje predatorima, postupci koji prouzrokuju težak i ireverzibilan bol i prekid senzomotorne organizacije, primena kompletnog Frojdovog adjuvansa, indukcija radijacione bolesti i sl. Eksperimentalne procedure "D" kategorije ne smeju prouzrokovati težak klinički oblik stresa u čijoj simptomatologiji preovlađuju nepoželjne promene u ponašanju, odsustvo samonege, dehidracija, abnormalna vokalizacija, prolongirana anoreksija, cirkulatorni kolaps, ekstremna letargija, nepokretnost, znaci teške lokalne i sistemske infekcije i dr.

– "E" - eksperimenti koji se zasnivaju na prouzrokovanju bola jakog intenziteta, blizu ili iznad praga tolerancije, neanesteziranih svesnih životinja. Primeri su primena mišićnih relaksanata ili paralitika, kao što su sukcinilholin ili drugi kurariformni lekovi koji se koriste samo radi obuzdavanja neanesteziranih životinja pri hirurškim intervencijama, nanošenje teških telesnih povreda, opekotina ili trauma neanesteziranim životinjama, testovi na toksičnost i eksperimentalne infekcije ili druge indukovane promene zdravstvenog stanja koje za posledicu imaju uginuće, pokušaj indukcije psihotičkog ponašanja životinja, metodi žrtvovanja životinje koji nisu propisani od nadležne laboratorijske institucije (npr. upotreba strihnina), indukcija teškog oblika nepovratnog stresa ili termičkog šoka. U većini zemalja koje priznaju ovu kategorizaciju izvođenje postupaka "E" kategorije – zabranjeno je.

Zaključak / Conclusion

U postojeću regulativu o zaštiti dobrobiti oglednih životinja inkorporirani su mnogi savremeni etički principi sa ciljem da se poboljša kvalitet svih aktivnosti u kojima čovek koristi ogledne životinje, da se poveća odgovornost istraživača i edukatora, da se poboljša kvalitet proizvoda koji se ispituju na oglednim životinjama, kao i da se obezbedi dobrobit oglednih životinja. Mada su ovi etički principi i različito formulisani svi su potekli iz osnovnih principa, odnosno pravila koja se primenjuju u zaštiti dobrobiti oglednih životinja, a to su: "3R pravilo", "pravilo 5 sloboda" i "Solna pravilo". Osim poštovanjem ovih osnovnih pravila, zaštita dobrobiti oglednih životinja postiže se i obaveznom kontinuiranom edukacijom osoblja koje u svojim delatnostima koristi ogledne životinje, sticanjem posebne dozvole za rad sa oglednim životinjama i posedovanje odobrenja od etičkog komiteta, koji može biti osnovan na institucionalnom, regionalnom i nacionalnom nivou, za korišćenje životinja iz podtipa kičmenjaka u istraživanjima, testiranjima i edukaciji.

Literatura / References

1. Vučinić Marijana: Ponašanje, dobrobit i zaštita životinja. VKS, Beograd, 388 str., 2004. - 2. Van Zutphen L.F.M.: History of animal use. In: Principles of laboratory animal science (L.E.M. Van Zutphen, V. Baumans and A.C. Beyen, eds.), Elsevier, Amsterdam, 2-5, 2001. - 3. Baumans V.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 24, 2, 503-514, 2005. - 4. Russell W.M.S. and Burch R.L.: The Principles of Humane Experimental Technique, London, UK: Methuen, 238, 1959. - 5. Brambell Committee: Report of the Technical Committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. Command paper 2836. Her Majesty's Stationary Office, London, 1965. - 6. A. Schuppli Catherine and Fraser D.: ATLA 33, 487-500, 2005. - 7. Anonimus: The Three Rs declaration of Bologna. In Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Proceedings of the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, Italy (ed. M. Balls, A-M. van Zeller, & M.E. Halder), Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., 15, 2000. - 8. Smith A. J., Allen T.: Animal Welfare 14, 347-359, 2005. - 9. Rusche B.: ALTEX 20, Suppl.1, 63-76, 2003. - 10. Mellor D. J., Reid C. S. W.: Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. In: Improving the Well-being of Animals in the Research Environment (ed. R.M. Baker, G. Jenkin & D.J. Mellor), Adelaide, Australia: ANZCCART, 3-18, 1993. - 11. Mellor D. J., Stafford K. J.: Australian Veterinary Journal 79, 762-768, 2001. - 12. Rickard D. M.: ATLA 32, Supplement 1, 225-227, 2004. - 13. Wells N., Nicholson J.: ATLA 32, Supplement 1, 417-421, 2004. - 14. OECD: Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 1996a. - 15. FELASA: Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe. A report prepared by the FELASA Working Group on Ethical Evaluation of Animal Experiments, 2005. - 16. CCAC: Categories of Invasiveness in Animal Experiments. Canadian Council on Animal Care, Constitution Square, Tower II, 315-350 Albert Street, Ottawa, Ontario, CANADA K1R 1B1, 1991.

ENGLISH

BASIC PRINCIPLES OF EXPERIMENTAL ANIMALS WELFARE PROTECTION

Marijana Vučinić

Ethical considerations of animal protection and welfare require that the use of experimental animals is limited as much as possible. Animal experiments should only be performed when no alternative is available and when the benefit of the experiment outweighs the suffering of the animal. This review paper describes the basic principles for the ethical use of experimental animals. These are: "Three Rs rule" (replacement, reduction and refinement), "five freedoms" for animals and "Solna principles". "Replacement" means the substitution for conscious living higher animals of insentient material. "Reduction" means reduction in the numbers of animals used to obtain information of a given amount and precision. "Refinement" means any decrease in the incidence or severity of inhumane procedures applied to those animals which still have to be used. The "five freedoms" are: freedom from hunger and thirst, freedom from adverse environmental impacts, freedom from disease and injury, freedom to exhibit normal behaviour and freedom from adverse mental states. "Solna principles" state that tests for regulatory purposes need to reflect the following: biological Relevance (meaningfulness and usefulness of a test for a particular purpose), Reliability (reproducibility of results within and between laboratories), and Regulatory acceptability (suitability of a test for risk assessment purposes (human health /environment)).

Key words: experimental animal, welfare, protection, 3Rs rule, five freedoms, Solna principles

РУССКИЙ

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОХРАНЫ БЛАГОСОСТОЯНИЯ ОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Марияна Вучинич

Этические начала охраны благосостояния опытных животных из подтипа позвоночных накладывают, что их употребление свести на наименьшую возможную меру, не только из этических, уже и из практических причин. опыты на позвоночных могут проводить только если не существуют соответствующие альтернативные модели и если страдание животных, используемые в опытах может оправдать пользами самого *in vivo* опыта. В этой работе, обзорного характера, вынесены основные этические принципы пользования опытных животных. Эти принципы суть: "3R правило", "правило 5 свобод" и "Соляна правило". Так называемое "3R правило" относится к замене опытных животных из подтипа позвоночных альтернативными животными моделями на низшей ступени эволюционного развития, растительными видами, животными и растительными культурами клеток и тканей, изолированными органами, физическими, механическими, химическими моделями, компьютерными симуляциями, уменьшение числа животных в опыте и усовершен-

ствованием опытной процедуры до степени на которой возможно вполне избежать или уменьшить неприятные телесные и эмоциональные опытности животных в опыте. "Соляна правило" относится к обосновыванию биологического благоприятства, повторительности и приемлемости *in vivo* опыта и альтернативных ани-мальных моделей.

Ключевые слова: опытные животные, благосостояние, охрана, ЗР правило, пять свобод, Соляна принципы

**OSNOVNI PRINCIPI PRIMENE I INTERPRETACIJE EKG-a
KOD KONJA***
*BASIC PRINCIPLES OF ECG APPLICATION AND INTERPRETATION
IN HORSES*

Ljubica Spasojević Kosić**

Tokom sprovođenja fizikalnog pregleda konja, ukoliko se prilikom auskultacije posumnja na aritmiju, elektrokardiografija omogućava postavljanje definitivne dijagnoze. Poznavanje osnovnih principa na kojima se bazira elektrokardiografija kao dijagnostička metoda, razumevanje normalne i patološke električne aktivnosti ćelija srca, kao i geneze elektrokardiograma, predstavlja neophodne preduslove za primenu elektrokardiografije u kliničkoj praksi. Klinička elektrokardiografija kod konja podrazumeva i poznavanje specifičnosti normalnog srčanog ritma kod konja, kao i parametre normalnog Ekg-a kod konja. Interpretacija elektrokardiograma konja obuhvata izračunavanje srčane frekvencije, procenjivanje srčanog ritma i detekciju prisustva abnormalnih kompleksa odnosno aritmija. Ovaj rad opisuje karakteristike normalnog elektrokardiograma konja i razmatra kako ih treba interpretirati.

Ključne reči: Ekg, konj, interpretacija

Pojam / Term

Elektrokardiografija kao konvencionalna metoda ispitivanja srca, obuhvata merenje amplitude i vremena razlike potencijala električne struje, koja je proizvedena tokom depolarizacije i repolarizacije srčanih struktura. Elektrokardiogram (Ekg) je grafički snimak voltaže proizvedene od strane ćelija srčanog mišića, nastale za vreme njihove depolarizacije i repolarizacije.

Elektrokardiografija, prema tome, meri samo električnu aktivnost srca, dok mehaničke funkcije srčane pumpe i valvula nisu obuhvaćene ovom dijagnostičkom metodom. Elektrokardiografija je nezamenljiva u praćenju ritma srca i

* Rad primljen za štampu 29. 11. 2007. godine

** Ljubica Spasojević Kosić, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

dijagnozi aritmija, ali nema značaj u proceni funkcija miokarda i dijagnostici uvećanja srca [5].

Pored konvencionalne elektrokardiografije, koja predstavlja snimanje elektrokardiografom životinje u stanju mirovanja, kod konja se nameće potreba korišćenja kontinuiranog dvadesetčetvoročasovnog (Holter) monitoringa [Zucca E. i sar., 2003]. Holter monitoring je naročito indikovano ukoliko postoje podaci o pojavi aritmija, sinkope ili ako aritmija ne može da bude dijagnostikovana tokom odmora i treninga ili Ekg ispitivanjima posle treninga [12, 14, 17].

Osnovni principi elektrokardiografije / *Basic principles of electrocardiography*

Elektrokardiografija se zasniva na generisanju električne struje od strane srca, provođenju tako stvorene struje kroz organizam i registrovanju razlike potencijala električne struje od strane aparata (galvanometra elektrokardiografa) pomoću elektroda koje povezuju određene tačke na površini organizma sa aparatom.

Srčane mišićne ćelije imaju sposobnost generisanja i širenja električne aktivnosti. Zahvaljujući električnoj aktivnosti srca, redosled srčane aktivnosti i kontrakcije je koordiniran.

Srce kao generator / Heart as "generator". Srce funkcioniše pod delovanjem nadražaja (impulsa, depolarizacionog talasa) koji se stvaraju u samom srcu, tačnije u sinoatrijalnom čvoru (SA čvor), smeštenom u blizini granične linije prednje šuplje vene sa desnom pretkomorom. Da bi se objasnilo poreklo nadražaja i način njegovog sprovođenja kroz miokard, potrebno je opisati izvesne "električne" karakteristike pojedinačne ćelije miokarda i dva osnovna svojstva srčanog tkiva: automatizam i sprovodljivost.

Ćelija je polarizovana kada se nalazi u mirovanju, odnosno kada unutrašnjost srčane ćelije ima negativan naboj u odnosu na spoljašnju stranu, tako da ćelijski potencijal membrane u mirovanju iznosi -90mV. Ćelijska membrana u mirovanju je skoro nepropustljiva za Na^+ i delimično propustljiva za K^+ . Ćelija je depolarizovana ili aktivna kada je unutrašnjost ćelije približno +15mV u odnosu na spoljašnju sredinu, što je posledica iznenadnog povećanja permeabilnosti membrane za Na^+ . Posledica depolarizacije je kontrakcija ćelije srčanog mišića. Repolarizacija ćelije predstavlja brzo isticanje K^+ iz ćelije (zbog povećanja propustljivosti membrane za K^+) i ima za posledicu vraćanje ćelije u stanje mirovanja.

Specijalizovani provodni sistem srca ima dve osnovne funkcije: 1. ćelije u specifičnim regionima sistema imaju svojstvo automatizma i mogu da iniciraju srčanu depolarizaciju; 2. ostatak sistema je odgovoran za provođenje električnih impulsa kroz srce na koordiniran način.

Sprovodni sistem srca je odgovoran za postojanje određenog toka depolarizacije srca. Ćelije sa povećanim automatizmom čine specijalizovano sprovodno tkivo, koje pokazuje nestabilnost membranskog potencijala sa poste-

penom, sporom depolarizacijom idući prema kraju ciklusa. Sprovodni sistem srca počinje SA čvorom, nastavlja se interatrijalnim snopovima (internodalnim traktovima), AV čvorom, Hisovim snopom, desnom i levom granom Hisovog snopa i završava se Purkinjeovim vlaknima u miokardu komora. Impuls se širi po ćelijama sprovodnog sistema srca, a zatim i po radnoj muskulaturi (sincicijumu pretkomora i komora). Brzina provođenja impulsa je velika sve do AV čvora, gde se veoma usporava zbog eferentne aktivnosti vagusa, da bi se potom ponovo povećala preko Hisovog snopa, njegovih grana i u Purkinjeovim vlaknima. Ovakva specijalizovana tkiva brzo provode električne impulse kroz srce, tako da se sva srčana vlakna sincicijuma pretkomora i komora kontrahuju simultano kako bi se proizvela snažna kontrakcija [Edwards N. J., 1987; Bonagura J. D., Reef V. B., 1998].

Autonomni nervni sistem utiče na procese depolarizacije i repolarizacije. Parasimpatikus smanjuje aktivnost SA čvora, povećava provođenje impulsa preko pretkomora skraćanjem trajanja akcionog potencijala pretkomora i usporava provođenje impulsa preko AV čvora. Suprotno ovome, simpatikus povećava srčanu frekvenciju i skraćuje atrioventrikularno provođenje impulsa. Trening kod konja utiče na prevagu parasimpatikusne nervna aktivnosti [13]. Parasimpatikusna aktivnost dominira tokom odmora i kod konja često varira sa promenama krvnog pritiska [Gedde L.A. i sar, 1965, cit. Bonagura J.D., Reef V.B., 1998]. Izražena sinusna aritmija i AV blok drugog stepena koji se često susreće kod normalnih konja prouzrokovani su menjanjem tonusa vagusa i služe da regulišu arterijski krvni pritisak u mirovanju (odmoru).

Organizam kao provodnik / *Organism as conductor*. Organizam se ponaša kao homogeni zapreminski provodnik i mesta postavljanja elektroda bitno utiču na dobijeni snimak.

Geneza elektrokardiograma (odvodi i elektrokardiograf) / *Genesis of electrocardiogram (leads and electrocardiograph)*. Odvodi predstavljaju elektrode koje povezuju određene tačke površine organizma sa elektrokardiografom. Elektrokardiograf ne predstavlja ništa drugo do galvanometar koji otkriva, pojačava i registruje promene u voltaži.

Svaki odvod, prema tome, predstavlja pogled na depolarizaciju i repolarizaciju srčanih struktura iz različitog ugla. Sistem odvoda koji se koristi kod konja je sličan onome koji se koristi kod ljudi, pasa i mačaka, mada se koriste i neki modifikovani odvodi kao što je odvod baza-apeks srca (vidi tabelu 1).

Kada se talas depolarizacije kreće prema pozitivnoj elektrodi, koja se nalazi na površini tela, pomoću elektrokardiografa se registruje pozitivan otklon. Negativan otklon se registruje, ako se talas depolarizacije udaljava od ove tačke. Otklon se ne pojavljuje ako talas depolarizacije "putuje" pod pravim uglom u odnosu na pomenutu tačku.

Tabela 1. Sistem odvoda kod konja /
Table 1. Leads system for horses

Odvodi u frontalnoj ravni / <i>Leads in frontal plane</i>
Bipolarni odvodi / Bipolar leads Odvod I = levi prednji ekstremitet (+) i desni prednji ekstremitet (-) / <i>Lead I = left front extremity (+) and right front extremity (-)</i> Odvod II = levi zadnji ekstremitet (+) i desni prednji ekstremitet (-) / <i>Lead II = left back extremity (+) and right front extremity (-)</i> Odvod III = levi zadnji ekstremitet (+) i levi prednji ekstremitet (-) / <i>Lead III = left back extremity (+) and left front extremity (-)</i> Unipolarni augmentirani odvodi / Unipolar augmented leads Odvod aVR = desni prednji ekstremitet (+) u odnosu na levi prednji i zadnji ekstremitet (-) / <i>Lead aVR = right front extremity (+) against left front and back extremity (-)</i> Odvod aVL = levi prednji ekstremitet (+) u odnosu na desni prednji i levi zadnji ekstremitet (-) / <i>Lead aVL = left front extremity (+) against right front and left back extremity (-)</i> Odvod aVF = levi zadnji ekstremitet (+) u odnosu na desni prednji i levi prednji ekstremitet (-) / <i>Lead aVF = left back extremity (+) against right front and left front extremity (-)</i>
Prekordijalni odvodi / Precordial leads Baza – apeks odvod = levi apeks srca (+) i desni jugularni žljeb (-) / <i>Base-apex lead = left heart apex (+) and right jugular channel (-)</i> V3 – u blizini apeksa srca (+) / <i>V3 – near heart apex (+)</i> V10 – iznad međuskapularnog prostora / <i>V10 – above interscapular space</i>

Depolarizacija pretkomora predstavljena je na Ekg-u kao P-talas. Vreme koje protekne od početka depolarizacije pretkomora do početka depolarizacije komora označeno je kao PQ ili PR interval. Ovaj interval se sastoji od P-talasa (period provođenja impulsa kroz pretkomore) i PR (PQ) segmenta (provođenje impulsa kroz AV čvor). Depolarizaciju komora elektrokardiograf beleži kao QRS kompleks. QRS kompleks može normalno da ispolji nekoliko varijacija oblika, što je posledica činjenice da različiti odvodi snimaju različit pogled na tok depolarizacije komora.

Tokom repolarizacije komora registruje se T-talas sa otklonom prilično male visine i obima promene voltaže. Otklon koji predstavlja repolarizaciju pretkomora (Ta) se često zabeleži kod konja, naročito pri bržim frekvencijama [Bonagura J.D., Reef V.B., 1998; Bonagura JD, 1985, Bonagura JD, Miller MS, 1985].

Klinička elektrokardiografija / Clinical electrocardiography

Tokom sprovođenja fizikalnog pregleda konja, ukoliko se prilikom auskultacije posumnja na aritmiju, elektrokardiografija omogućava postavljanje definitivne dijagnoze. Sa druge strane, značajnost elektrokardiografskog nalaza mora da se interpretira u svetlu kliničkih simptoma koje životinja ispoljava [11, 3].

Tehnika snimanja Ekg-a / ECG filming technique

Najbolje mesto na kojem se može napraviti Ekg snimak dobrog kvaliteta je boks u kojem konj boravi, jer je u svom okruženju životinja najmanje uzbuđena. U toku snimanja Ekg-a, potrebno je da pacijent ima suv dlačni pokrivač i da se nalazi na izolovanoj suvoj površini. Snimanje se vrši na životinji koja stoji. Preporučuje se korišćenje gumenih prostirki na kojima životinja treba da stoji, da bi se smanjile električne smetnje. Elektrode se spajaju za kožu pacijenta pomoću aligator štipaljki ili se koriste metalne elektrode sa gumenim kaiševima koji se zategnu na mesta postavljanja elektroda, prema navedenom sistemu odvoda, koji se koristi kod konja (u tabeli 1 je prikazan sistem odvoda koji se koristi kod konja). Da bi se povećala sprovodljivost od kože na elektrode, na kožu se stavlja elektrodna pasta ili alkohol.

Uobičajeno baždarenje instrumenta se vrši pri 1 cm = 1 mV, što znači da svaki mali kvadrat od 1 mm na milimetarskom papiru predstavlja 0,1 mV na vertikalnoj osovini papira. Pored ovoga, može da se koristi i drugačije baždarenje instrumenta (1 mV = 2 cm ili 1 mV = 0,5 cm). Preporučuje se za konje upotreba brzine od 25 mm/s pri snimanju Ekg-a. Značenje upotrebe ove brzine snimanja je u tome da svaki mali kvadrat od 1 mm predstavlja na horizontalnoj osovini vreme od 0,04 s. Trajanje pojedinih oblika električne aktivnosti srca može da se odredi brojanjem kvadrata i množenjem njihovog broja sa 0,04s [5].

Interpretacija Ekg-a / Interpreting ECG

Snimak elektrokardiograma treba sistematično pregledati, što podrazumeva određivanje frekvencije, ritma, određivanje srednje električne osovine depolarizacije, merenje parametara Ekg-a i njihovo upoređivanje sa referentnim vrednostima (tabela 2).

Tabela 2. Vrednosti parametara normalnog Ekg-a kod konja /
Table 2. Normal ECG parameter values in horses

Parametar / <i>Parameter</i>	Maksimalna vrednost / <i>Maximal value</i>
Frekvencija / <i>Frequency</i>	28 – 44/min
P talas / <i>P wave</i>	0,16 s
PR interval / <i>PR interval</i>	0,38 – 0,48 s
QRS kompleks / <i>QRS complex</i>	0,14 s
R-talas (I odvod) / <i>R wave (lead I)</i>	0,8 – 1,1 mV
R-talas (II odvod) / <i>R wave (lead II)</i>	do 2,2 mV / <i>up to 2.2 mV</i>
QT interval / <i>QT interval</i>	0,575 s
Osovina / <i>Axis</i>	0- 100°

Postoji nekoliko metoda za određivanje srčane frekvencije. Najbrži način je da se broj 1500 подели brojem kvadratića (na milimetarskoj hartiji Ekg

trake) između dva susedna R-talasa (ako se za snimanje koristi brzina od 25 mm/sec.).

Normalni ritam srca je sinusni ritam, ali kod pojedinih životinjskih vrsta pored normalnog sinusnog ritma i drugi ritmovi se susreću kod potpuno zdravih jedinki. Normalni sinusni ritam je regularni ritam poreklom iz sinusnog čvora. Njegove karakteristike na Ekg-u su postojanje P-talasa, QRS kompleksa i T-talasa za svaki otkucaj srca. Sinusna aritmija je regularno iregularni ritam i sinhrona je sa respiracijama (ubrzanje frekvencije srca pri inspirijumu i usporavanje frekvencije srca pri ekspirijumu). Kod konja se pored normalnog sinusnog ritma i sinusne aritmije, AV blok prvog i drugog stepena, vagusnog porekla smatraju normalnim ritmom. Sinusna aritmija i AV blok su uslovljeni delovanjem vagusa, pa prema tome, trening ili uzbuđenje vode prelasku u regularni sinusni ritam [13, 15, 10].

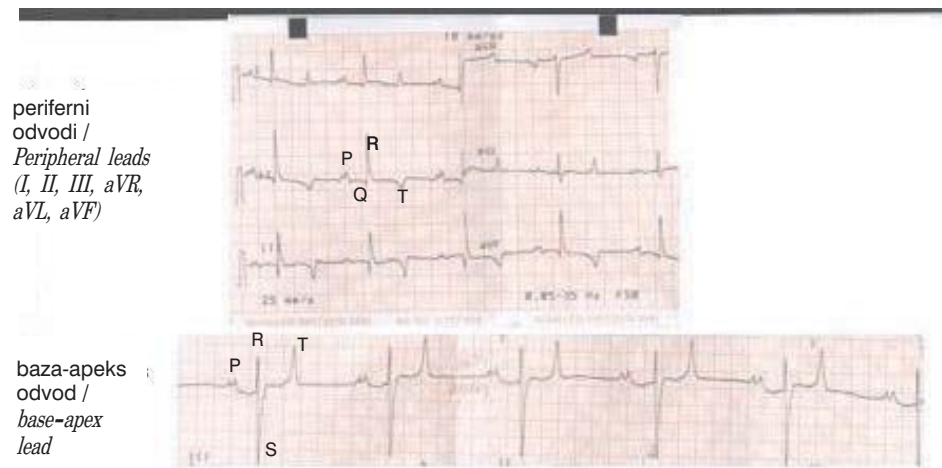
Sistem odvoda u frontalnoj ravni treba pregledati da bi se proverila srednja električna osovina srca (srednja električna osovina depolarizacije ili prosečni talas depolarizacije). Srednja električna osovina srca se izražava u stepenima, zato što svaki odvod nosi određenu vrednost stepeni u frontalnoj ravni (odvod I ima vrednost 0° , odvod II – 60° , odvod III – 120° , odvod aVR – (-150°) , aVL – (-30°) , aVF – 90°). Izračunati srednju električnu osovinu srca u stvari znači pronaći odvod u kome QRS kompleks pokazuje najveću neto pozitivnu vrednost. Gruba procena pravca osovine depolarizacije komora tj. QRS kompleksa može se izvršiti najbrže tako što se nađe odvod gde QRS kompleks ima najveću neto pozitivnu vrednost. Osovina se pruža ka pozitivnom polu tog odvoda. Osovina srca je kod ždrebad i jednogodišnjaka varijabilna i često je orjentisana kranijalno, dok je kod većine odraslih konja orjentisana levo i kaudalno. Abnormalne devijacije osovine se susreću kod kardiomegalije, cor pulmonale, poremećaja provođenja impulsa i poremećaja elektrolita [19].

P-talas Ekg-a je posledica depolarizacije pretkomora. Normalno se proces depolarizacije pretkomora kreće sa desna na levo i kranio-kaudalno, što bi značilo da bi P-talas trebalo da bude pozitivan u I, II i aVF odvodu. P talas može da bude nazubljen (oblika slova M), jedinstven, bifazičan (negativno/pozitivan) ili čak polifazičan. U okviru istog odvoda Ekg-a mogu da postoje različite forme P-talasa i da njihov izgled varira od talasa do talasa. Ovo je normalna, fiziološka pojava kod konja i ukazuje na lutajući pejsmejker. Tokom tahikardije skraćuje se trajanje P talasa, on postaje visok i šiljat i praćen je izraženom repolarizacijom pretkomora, što se na Ekg-u vidi kao vidljivi pretkomorni T-talas (Ta) u okviru PR intervala. Ova činjenica elektrokardiografsku dijagnozu uvećanja pretkomora čini veoma teškom. U slučaju negativno-pozitivnog P-talasa inicijalni vrh je prouzrokovan depolarizacijom srednje i kaudalne trećine desne pretkomore, dok je drugi vrh posledica aktivacije pretkomornog septuma i medijalne površine leve pretkomore [2, 4].

PR interval se meri od početka P-talasa do početka QRS kompleksa, a ima značenje depolarizacije pretkomora i provođenje impulsa do AV čvora. Interval se menja sa promenom srčane frekvencije, i promene PR intervala su u korela-

ciji sa promenama krvnog pritiska. Kod konja se javlja fiziološki AV blok prvog stepena, odnosno usporeno provođenje impulsa kroz AV čvor, pa je određivanje maksimalnih normalnih vrednosti PR intervala veoma teško. Kašnjenje ili nemogućnost provođenja impulsa sa pretkomora na komore predstavlja atrioventrikularni blok. Ovakav poremećaj provođenja impulsa je klasifikovan kao AV blok prvog, drugog ili trećeg stepena. AV blok prvog stepena postoji kada PR interval prevazilazi normalne vrednosti, odnosno kada impuls kasni, ali se još uvek prenosi preko AV sprovodnog sistema i aktivira komore, prouzrokujući QRS na elektrokardiogramu. Drugi stepen AV bloka znači da se impuls povremeno ne provodi od pretkomora na komore. Ovakav poremećaj provođenja impulsa se na elektrokardiogramu dijagnostikuje pri postojanju P-talasa koga ne slede QRS-T kompleksi [15, 18].

Morfologija QRS kompleksa je varijabilna kod konja. QRS kompleks predstavlja depolarizaciju komora i, zavisno od određenog odvoda, neke komponente mogu da ne budu prisutne. Ne treba zaboraviti da različiti odvodi depolarizacioni talas "vide" iz različitog ugla. Kompletna penetracija sprovodnog sistema u zidove obe komore srca kod konja omogućava simultanu aktivaciju obe komore. Ovo je i razlog zašto se iz širine QRS kompleksa i amplitude R zupca kod konja ne može izvesti zaključak o dimenzijama leve i desne komore [Hamlin R.L. i sar.,



Slika 1. Ekg konja snimljen pri brzini od 25 mm/sec., pri baždarenju instrumenta od 10 mm = 1 mV, u perifernim odvodima (I, II, III, aVR, aVL, aVF) i baza-apeks prekordijalnom odvodu. Interpretacija Ekg: frekvencija 39/min., ritam sinusni, osovina ~60°, P = 0,12 s, PR = 0,28 s (II odvod) i 0,36 s (baza-apeks), QRS < 2,2 mV (II odvod), QT = 0,48 s. Ekg dg: normalni elektrokardiogram konja /

Figure 1. ECG in a horse recorded at a rate of 25 mm/sec., at instrument calibration of 10 mm = 1 mV, in peripheral leads (I, II, III, aVR, aVL, aVF) and apex base in precordial lead. ECG interpretation: frequency 39/min., sinus rhythm, axis ~60°, P = 0.12 s, PR = 0.28 s (lead II) and 0.36 s (base-apex), QRS < 2.2 mV (lead II), QT = 0.48 s. ECG dg: normal horse electrocardiogram

1964; Hamlin R.L., Smith C.R., 1965; cit. Bonagura J.D., Reef V.B., 1998]. Prosečna vrednost amplitude R-talasa u odvodu II kod zdravih trkačkih konja je 0,8 – 1,1 mV. Vrednosti preko 2,2 mV amplitude R-talasa u odvodu II i preko 1,7 mV u odvodu I, obično predstavljaju abnormalne vrednosti. Povremeno se, međutim, kod zdravih konja može naići na vrednosti koje prevazilaze navedene granične vrednosti [4, 7, 8].

T-talas predstavlja repolarizaciju komora. Vektor-T talasa se često prostire prema pozitivnom polu odvoda III, što znači da se pozitivan T-talas javlja u odvodu III. Potrebno je istaći da nema jedinstvenog mišljenja i stava kada je reč o elektrokardiografskom značenju i vrednosti T-talasa kod konja. Devijacija ST segmenata kod konja sa hipovolemijom ili šokom ukazuje na ishemiju miokarda, dok se uvećanje T-talasa može razviti kod hipoksije miokarda ili hiperkalijemije. Ekstremna labilnost T-talasa čini interpretaciju promena T-talasa prilično teškom. Postoje dokazi da T-talasi menjaju polarnost u zavisnosti od faze treninga, pri čemu talasi u prekordijalnim odvodima postaju pozitivni i zašiljeni (amplituda T-talasa >1 mV) [2, 1, 9].

QT interval počinje od početka QRS kompleksa i traje do kraja T-talasa, a od malog je kliničkog značaja. Interval se skraćuje sa povećanjem srčane frekvencije [16].

Literatura / References

1. Baha S.: Estimation de l'état de forme des chevaux de course par la morphologie de l'onde T après effort – Etude par la méthode de Holter. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 142, 125 – 129, 1991.
2. Bonagura J. D., Reef V. B.: Cardiovascular diseases, In Reed S.M., Bayly W.M.: *Equine internal medicine*, Saunders, Philadelphia, 1998.
3. Bonagura J. D.: Equine heart disease, an overview. *Vet Clin North Am Equine Practice*, 1, 2, 267-274, 1985.
4. Bonagura J. D., Miller M. S.: Electrocardiography. In Jones WE (ed.): *Equine Sport Medicine*, Philadelphia, Lea&Febiger, 89-106, 1985.
5. Dark P. G. G., Bonagura J. D., Kelly D. F.: Electrocardiography. In Dark P.G.G., Bonagura J.D., Kelly D.F (eds.): *Color Atlas of Veterinary Cardiology*, Mosby-Wolfe, 1996.
6. Edwards N. J.: History and principles of electrocardiography. In: Pedersen D. (editor): *Bolton's handbook of canine and feline electrocardiography*, Philadelphia, W.B. Saunders, 1-32, 1987.
7. Fregin G. F.: The equine electrocardiogram with standardized body and limb positions. *Cornell Vet*, 72, 304-324, 1982.
8. Fregin G. F.: Medical evaluation of the cardiovascular system. *Vet Clin North Am Equine Practice*, 8, 2, 329-346, 1992.
9. King C. M., Evans D. L., Rose R. J.: Significance for exercise of some electrocardiographic findings in racehorses. *Aust Vet J*, 71, 7, 200-202, 1994.
10. McGuirk S. M., Muir W. W.: Diagnosis and treatment of cardiac arrhythmias. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1, 2, 353-370, 1985.
11. Menzies-Gow N.: ECG interpretation in the horse. *In Practice*, 23, 454-459, 2001.
12. Mitten L. A.: Cardiovascular causes of exercise intolerance. *Vet Clin North Am Equine Practice*, 12, 473-494, 1996.
13. Ohmura H., Hiraga A., Aida H., Kuwahara M., Tsubone H.: Effects of initial handling and training on autonomic nervous function in young Thoroughbreds. *Am J Vet Res*, 63, 11, 1488-1491, 2002.
14. Raekallio M.: Long term ECG recording with Holter monitoring in clinically healthy horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33, 71-75, 1992.
15. Rezakhani A., Godarzi M., Tabatabaei Naeini I.: A combination of atrioventricular block and sinoatrial block in a horse. *Acta Vet Scand*, 46, 3, 173-175, 2005.
16. Scarda R. T., Muir W. W., Milne

D. W., Gabel A. A.: Effects of training on resting and postexercise ECG in standardbred horses, using a standardized exercise test. *Am J Vet Res*, 37, 12, 1485-1488, 1976. - 17. Scheffer C. W. J., Robben J. H., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M. M.: Continuous monitoring of ECG in horses at rest and during exercise. *Veterinary Record*, 7, 371-374, 1995. - 18. Vibe-Petersen G., Nielsen K.: Electrocardiography in the horse (A report of findings in 138 horses). *Nord Vet Med*, 32, 3-4, 105-121, 1980. - 19. White N. A., Rhode E. A.: Correlation of electrocardiographic findings to clinical disease in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 164, 1, 46-56, 1974. - 20. Zucca E., Ferrucci V., DiFabio V., Croci C., Ferro E.: The use of electrocardiographic recording with Holter monitoring during treadmill exercise to evaluate cardiac arrhythmias in racehorses. *Veterinary research communications* 27 Suppl. 1, 811-814, 2002.

ENGLISH

BASIC PRINCIPLES OF ECG APPLICATION AND INTERPRETATION IN HORSES

Ljubica Spasojević Kosić

If an arrhythmia is suspected on cardiac auscultation, electrocardiography will make possible a definitive diagnosis. Knowledge of the basic principles of the electrocardiography as diagnostic method, understanding of the normal and pathologic cardiac cell electrical activity, as well as genesis of the electrocardiogram, represent the prior condition for applied electrocardiography in clinical practice. Clinical electrocardiography in horses implies knowledge of the normal equine heart rhythm and ECG parameters values. Interpretation of the electrocardiogram include determination of heart rate and rhythm and detection of the presence of abnormal complexes. This article described characteristics of the normal equine ECG and discussed their interpretation.

Key words: ECG, horse, interpretation

РУССКИЙ

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ЭКГ У ЛОШАДЕЙ

Любица Спасоевич Косич

В течение проведения физического осмотра лошадей, насколько при аускультации усомнится на аритмию, электрокардиография дает возможность определение окончательного диагноза. Познание основных принципов на которых базируется электрокардиография как диагностический метод, понимание нормальной и патологической электрической активности клеток сердца, как и генеза электрокардиограммы, представляет собой необходимые предварительные условия для применения электрокардиографии в клинической практике. Клиническая электрокардиография у лошадей подразумевает и познание специфичности нормального сердечного ритма у лошадей, словно и параметры нормального ЭКГ-а у лошадей.

Интерпретация электрокардиограммы лошадей охватывает исчисление сердечной частоты, оценка сердечного ритма и детекции присутствия ненормальных комплексов то есть аритмия. Эта работа описывает характеристики нормальной электрокардиограммы лошадей и рассматривает как их надо интерпретировать.

Ключевые слова: ЭКГ, лошадей, интерпретация

HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS OF RABBIT COLIBACTERIOSIS, CAUSED BY ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* (O15:H-)*
HISTOPATOLOŠKA ISTRAŽIVANJA KOLIBAKTERIOZE KOD KUNIĆA IZAZVANE ENTEROPATOGENOM BAKTERIJOM ESCHERICHIA COLI (O15:H-)

V. Petrov, M. Alexandrov, S. Lasarova, M. Lyutskanov**

The histopathological alterations in the intestinal tract of recently weaned rabbits with experimental and spontaneous Escherichia coli (O15:H-) infection were followed. A considerable shortening and thickening of well epithelized intestinal villi were observed, whose tips, after a Warthin-Starry staining, were profusely colonized with coliform bacteria. The observed pathological pattern was a permanent finding in such infections and could be used as a pathognomic feature in the differential diagnosis of spontaneous diarrhoeic syndromes. The adhesion of colibacteria to enterocytes, together with the data from the bacteriological studies (isolation, identification, determination of the O-serogroup affiliation and the biochemical behaviour) allowed the assignment of isolates to the group of enteropathogenic E. coli (EPEC). Only when required, more detailed diagnostical procedures as PCR, could be performed.

Key words: colibacteriosis, enteropathogenic E. coli (EPEC)

Introduction / Uvod

During the last three decades, a number of investigators have emphasized the role of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a leading bacterial agent in diarrhoeic diseases in rabbits during the first post weaning weeks. This group of colibacteria, categorized as a pathovar, is distinguished with the absence

* Rad primljen za štampu 12. 7. 2007. godine

** Vladimir Petrov, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria; M. Alexandrov, S. Lasarova, Institute of Experimental Pathology and Parasitology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria; M. Lyutskanov, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

of toxin production and invasiveness. The pathogenic effect of EPEC is realized through alterations in the cytoskeleton of enterocytes [30, 16, 17].

The epidemiology of the disease, the methods of diagnostics, the alternatives for control and eradication have been investigated [18, 4, 23, 24].

Via both scanning and transmission electron microscopy, it was evidenced that the most important micromorphological changes consisted in the adhesion of smaller or larger groups of colibacteria on the enterocytes and the M-cells on Payer's patches. As a result of this adherence and the consequent changes in the cytoskeleton of the intestinal epithelium, the intestinal villi become considerably shortened and the intestinal mucosa – thinner [14, 22, 31, 9].

This kind of studies are still limited, and in Bulgaria, have not been performed up to the present. That is why our objective was to follow the light microscopic features of the intestinal tract in rabbits with experimental and spontaneous *E. coli* (O15:H-) infection.

Materials and methods / Materijal i metode ispitivanja

Animals and experimental design / Životinje i eksperimentalni plan

In this study, 30 rabbits were included, divided into two groups as follows:

Group I included 15 animals with experimental colibacteriosis provoked by the highly pathogenic *E. coli* U83/39 (serotype O15: H-) strain.

Group II consisted of 15 rabbits, offspring of does, experimentally infected during a previous experiment with the same *E. coli* strain. Part of these animals exhibited signs of spontaneous intestinal diarrhoea.

All animals from both groups, participating in the experiment, were weaned at the age of 30 days and did not shed *Eimeria spp.* oocysts at the time of weaning.

E. coli strain / Soj E.coli

The experimental colibacteriosis was induced by an enteropathogenic *E. coli* U83/39 (O15: H-) strain, kindly provided by Dr. J. E. Peeters, from the National Institute of Veterinary Research, Brussels, Belgium. It served to prepare a bacterial suspension with a density of 3×10^7 c.f.u./ml.

Bacteriological studies / Bakteriološka istraživanja

Rectal swab samples were analyzed for detection of the causing agent in the rabbits from group I as well as for the determination of the presence of enteropathogenic *E. coli* in the rabbits with spontaneous disease (group II) that manifested an intestinal indigestion. The routine bacteriological techniques for isolation and classification of enterobacteria as well as of identification of colibacteria were utilized [29]. The O-serogroup affiliation of *E. coli* isolates was determined [29].

Histological studies / Histološka istraživanja

After euthanasia of rabbits by the 3rd-4th day of the clinical manifestation of the disease, ileal loops were obtained for a histological study after ligation from both ends, filling and placement in 10% buffered formalin for 72-96 h. From them, rings with a height of 5 mm were prepared, embedded in paraffin, 6-8 µm sections were cut and stained with haematoxylin/eosin and according to Warthin-Starry [11], using routine histological techniques.

The observations were performed on a transmitted light NU-2 microscope.

Results and discussion / Rezultati i diskusija

In animals with experimental *E. coli* U83/39 (O15: H-) infection, a considerable shortening and thickening of well epithelized intestinal villi was observed (Fig. 1), whose tips, after Warthin-Starry staining, appeared massively colonized with coliform bacteria (Fig. 2) and at numerous sites, their propria was infiltrated with pseudoeosinophils (Fig. 3).

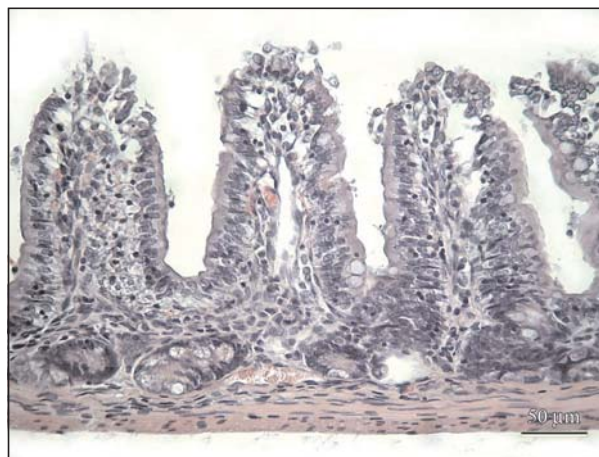


Figure 1. Ileum of a rabbit with experimental *E. coli* U83/39 (O15: H-) infection. Strongly shortened, thickened and well epithelized intestinal villi with hyperaemic propria and disintegrated epithelium on the tips. Hematoxylin/eosin staining

Slika 1. Ileum kunića sa eksperimentalnom infekcijom *E.coli* U83/39 (O15: H-). Veoma skraćene, zadebljane i dobro epitelizovane intestinalne resice sa hiperemičnom propriom i disintegrisanim epitelom na vrhovima. Bojenje hematoksilin eozinom

In rabbits, offspring of EPEC-infected does, apart from the histopathological changes specific for colibacteriosis, a weaker or more severe infection with *Eimeria* spp. was also present (Fig. 4).

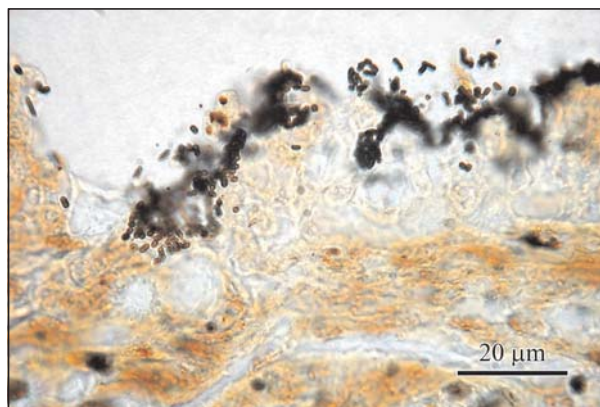


Figure 2. Ileum of a rabbit with experimental *E. coli* U83/39 (O15: H-) infection. An intestinal villus, colonized by coliform bacteria. Warthin-Starry staining

Slika 2. Ileum kunića sa eksperimentalnom infekcijom *E. coli* U83/39 (O15: H-). Intestinalna resica kolonizirana koliformnim bakterijama. Bojenje po Wartin-Stari metodi

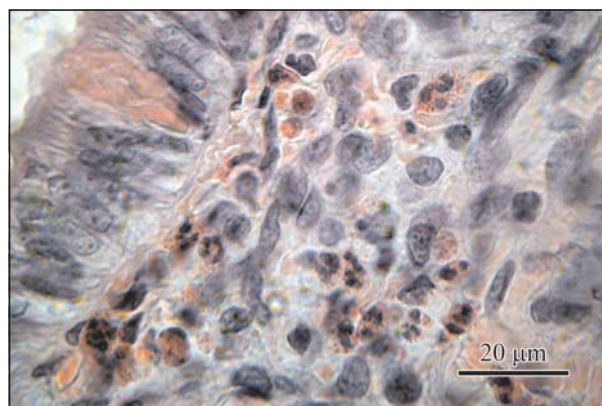


Figure 3. Ileum of a rabbit with experimental *E. coli* U83/39 (O15: H-) infection. The propria is infiltrated with pseudoeosinophils. Hematoxylin/eosin staining

Slika 3. Ileum kunića sa eksperimentalnom infekcijom *E. coli* U83/39 (O15: H-). Propria je infiltrirana pseudoeozinofilima. Bojenje hematoksilin eozinom

According to the present studies in rabbits with experimental and spontaneous *E. coli* (O15:H-) infection, the histological alterations due to EPEC are related to the atrophy of intestinal villi, vacuolization, increased amount of cytoplasm, impaired structure of the superficial epithelial layer of the intestinal mucous coat, presence of desquamated cells in the lumen. These injuries according to a number of authors take place gradually and consecutively, occurring initially at a cell level [30, 16, 17].

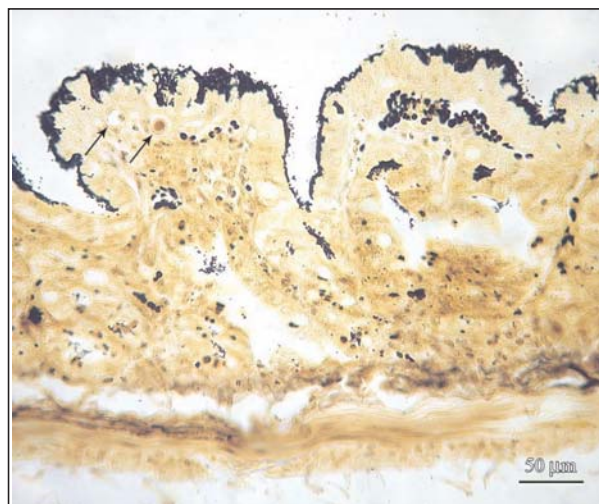


Figure 4. Ileum of a rabbit with spontaneous *E. coli* (O15:H-) infection. Distinctly shortened, thickened intestinal villi with single enterocytes, infected with *Eimeria* spp. (arrows). The tips of the villi are covered with coliform bacteria. Warthin--Starry staining

Slika 4. Ileum kunića sa spontanom infekcijom *E. coli* (O15:H-). Jasno skraćene, zadebljane intestinalne resice sa po jednim enterocitom, inficirani *Eimeria* spp. (strelice). Vrhovi resica su prekriveni koliformnim bakterijama. Bojenje po Vartin-Stari metodi

According to Milon (1996) this process occurs in three stages:

– *Attachment / Vezivanje*. Initially, the bacteria are loosely attached to enterocytes via plasmid-determined fimbrial adhesins, called bundle forming pili (BFP).

– *Effacement / Brisanje*. The alterations in the cytoskeleton are resulting from the action of several functional proteins, synthesized after the attachment. A number of chromosome genes, located adjacently and forming the so-called "pathogenicity island" or "locus of enterocyte effacement" (LEE), are responsible for their synthesis.

– *Cytoskeleton reorganization / Citoskeletna reorganizacija*. The actin undergoes a change from filamentous into globular and this results in an altered enterocyte cytoskeleton. The change consists in the formation of pedestal-like structures and effacement of the microvilli.

On the other side, it was shown that the changes in membrane proteins blocked the transport systems of the colonized enterocyte, impairing the absorption of water, the excretion and absorption of ions (Law 1994). The histopathological picture of this process is manifested through the rounding of epithelial cells and subsequent disorganization of the entire superficial layer of enterocytes in affected areas.

In some cases, ovoid bacteria on the epithelial surface, but not in the cell's cytoplasm or the deeper layers of the mucous coat, could be observed.

In some parts of the lamina propria, weak to moderate oedema and infiltration with pseudoeosinophils was observed. Also, hyperaemia and mucosal haemorrhages were noticed [5, 20, 21].

Similarly to our studies, after the special Warthin--Starry staining and in other reports in EPEC involvement in rabbits using scanning electron microscopy, small or bigger clusters of colibacteria, tightly attached to the surface of enterocytes and particularly on enterocytes, covering the Payer's patches without presence of diffuse adherence, have been observed [31, 9, 22, 14]. It seemed that this pathological pattern was a permanent finding in such infections and could be used as a pathognomic feature in field cases, indicative of the need for further diagnostic studies.

The detection of *Eimeria* spp. oocysts in some animals is most probably a co-infection, due to the lack of application of coccidiostatics, but it could be supposed that the simultaneous *Eimeria* spp. infection aggravated the pathological features of colibacteriosis.

References / Literatura

1. Blanco J. E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Cuervo L., Balsalobre C., Muñoa F.: Prevalence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* with *eae* gene in diarrhoeic rabbits. *Microbiology and Immunology*, 41, 77-82, 1997. - 2. Bodon L. and Prohaszka: Isolation of an adenovirus from rabbits with diarrhoea. *Acta Vet. Acad. Scient. Hung.*, 28, 247-255, 1980. - 3. Borriello S. P. and Carman R. J.: Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. *J. Clin. Microbiol.*, 17, 414-418, 1983. - 4. Camguilhem R.: Isolement d'une souche d'*Escherichia coli* (sérogrupe O103) responsable d'entérite colibacillaire du lapin en engraissement. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 136, 61-68, 1985. - 5. Cantey J. R. and R.K. Blake: Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.*, 135, 454-462, 1977. - 6. Eckert J., Taylor M., Licois D., Coudert P., Catchpole J., Bucklar H.: Identification of *Eimeria* and *Isospora* species and strains. Morphological and biological Characteristics. In: *Biotechnology. Guidelines of Techniques in coccidiosis Research.* (Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P., Ed) pp 103-119. Office for official publications of the European communities. Luxemburg, 103-119, 1995. - 7. Finazzi G., Cardeti G., Pacciarini M. L., Losio M., Tagliabul S.: Characterization of strains *Escherichia coli* isolated from rabbits with enteritis in Lombardia and Emilia-Romagna during 1997-1999. 7th World Rabbit Congress, 2000. - 8. Fries A. S.: Tyzzer's disease and importance of inapparent infection in biomedical research. Doctoral thesis at the Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 1981. - 9. Inman L. R. and J. R. Cantey: Specific Adherence of *Escherichia coli* (Strain RDEC-1) to Membranous (M) Cells of the Peyer's Patch in *Escherichia coli* Diarrhea in the Rabbit, *The Journal of Clinical Investigation*, 71, 1-8, 1983. - 10. Jerse A. E., Yu J., Tall B. D., Kaper J. B.: A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7839-7843, 1990. - 11. Kerr D. A.: Improved Warthin-Starry method for tissue sections; *Am J Clin Pathol*, 8, 63-67, 1938. - 12. Laplace J. P.: Le transit digestif chez les monogastriques. III. Comportement (prise de nourriture - caecotrophie), motricité et transit digestifs, et pathogénie des diarrhées chez le lapin. *Ann. Zootech.*

- 27, 25-265, 1978. - 13. Law D.: Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 7, 152-173, 1994. - 14. Licois D., Reynaud A., Federighi M., Gaillard-Martinie B., Guillot J. F., Joly B.: Scannig and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropatogenic and/or enterohaemorrhagic strain GV in enteric infection in rabbits. Infect. Immun., 59, 10, 3796-3800, 1991. - 15. Löliger H. C.: Erkrankungen des Darmes beim Kaninchen. Ursachen und Bekämpfungsmöglichkeiten. In: Memoria del II congreso mundial de cunicultura, Barcelona. II. Nutricion pathologica, 265-282, 1980. - 16. Milon A. Weaned rabbit colibacillosis: a model for study of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 1996. - 17. Nataro J. P. and Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli* Clin. Microbiol. Rev., 11, 142-201, 1998. - 18. Okerman L., Lintermans P., Coussement W., Devrise L. A.: *Escherichia coli* ne produisant pas d'enterotoxine comme agents d'entérite chez le lapin avant le sevrage. Recl. Méd. Vét. 158, 467-472, 1982. - 19. Peeters J. E.: Coccidioseen zijn bestijding in de industriële konijnenteelt. Proefschrift licentie zoötechnie, RUG, faculteit dierdeneeskunde, Gent., 1-24, 1981. - 20. Peeters J. E., Geeroms R., Glorieux B.: Experimental *Escherichia coli* enteropathy in weanling rabbits; clinical manifestations and pathological findings. J. Clin. Path., 94, 521-528, 1984a. - 21. Peeters J. E., Phol P., Charlier G.: Infectious agents associated with diarrhoea in comercial rabbits; a field study. Ann. Rech. Vet. 15, 24-29, 1984b. - 22. Peeters J. E., Charlier G. J., Raeymaekers R.: Scannig and transmission electron microscopy of attaching effacing *Escherichia coli* in weanling rabbits. Vet. Pathol. 22, 54-59, 1985. - 23. Peeters J. E.: Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits Seminar in the community programme for the coordination of agriculture research, 6-7 november, Edited by Teresa Auxilia, 127-137, 1986. - 24. Peeters J. E. and Geeroms R.: Traitement et eradication de la colibacillose (serotype O15:K:H-) sur le terrain. Journées de la recherche cunicole 12-13 decembre, Paris. Communication, 1, 1-8, 1990. - 25. Penteado A. S., Ugrinovich L. A., Corrêa S. da S., Oliveira M. N., de Castro A. F. P., de Ávila F. A.: Detecção do gene *eae* em amostras de *Escherichia coli* (AEEC) isoladas de coelhos de criações do estado de São Paulo, Brasil., Ars Veterinaria, 17, 3, 207-212, 2001. - 26. Penteado A. S., Ugrinovich L. A., Blanco J., Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Andrade J. R. C., Corrêa S. S., Pestana de Castro A. F.: Serobiotipos and virulence genes of *Escherichia coli* stains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. Vet. Microbiol. 89, 41-51, 2002. - 27. Petric M., Middleton P. J., Grant C., Tan J. T., Hewitt C. M.: Lapine rotavirus: preliminary studies of epizootology and transmission. Can. J. Comp. Med., 42, 143-147, 1978. - 28. Prescott J. F.: Intestinal disorders and diarrhoea in the rabbit. Veterinary Bulletin, 48, 457-480, 1978. - 29. Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K., Carter G. R.: Clinical Veterinary microbiology. Harcourt Publishers Limited. 209-237, 1999. - 30. Rosenshine I., Donenberg M. S., Kaper J. B., Finalay B. B.: Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells; EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangements and bacterial uptake. EMBO J. 11, 3551-3560, 1992. - 31. Takeuchi A.: Scannig and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC - 1) enteric infection in rabbits. Infect. Immun., 19, 686-694, 1978. - 32. Wescott R. B.: Helminth parasites. In: Biology of the laboratory rabbit. Eds. S. H. Weisbroth, R. E. Flatt and A. L. Krauss. Academic Press, New York, pp. 317-326, 1974. - 33. Whitney J. C.: A review of non-specific enteritis in the rabbit. Laboratory Animal Science, 10, 209-221, 1976.

SRPSKI

HISTOPATOLOŠKA ISTRAŽIVANJA KOLIBAKTERIOZE KOD KUNIĆA IZAZVANE ENTEROPATOGENOM BAKTERIJOM *ESCHERICHIA COLI* (O15:H-)

V. Petrov, M. Aleksandrov, S. Lasarova, M. Ljutskanov

Praćene su histopatološke promene na intestinalnom traktu tek zalučenih kunića sa eksperimentalnom ili spontanom infekcijom bakterijom *Escherichia coli* (O15:H-). Zapažena su znatna skraćenja i zadebljanja dobro epitelizovanih intestinalnih resica, na čijim vrhovima su uočljive bogato kolonizirane koliformne bakterije, posle bojenja po Vartin-Stari metodi. Uočena patološka šema predstavlja konstantni nalaz kod takvih infekcija i mogla bi se upotrebiti kao patognomska karakteristika kod diferencijalne dijagnoze spontanih sindroma dijareje. Adhezija kolibakterija na enterocite, zajedno sa podacima iz bakterioloških studija (izolacija, identifikacija, određivanje pripadnosti O-serogrupi i biohemijsko ponašanje) omogućilo je da se odredi da izolati pripadaju grupi enteropatogene *E. coli* (EPEC). Detaljnije dijagnostičke procedure, kao što je PCR, mogu se vršiti samo ukoliko je neophodno.

Ključne reči: kolibakterioza, enteropatogena *E. coli* (EPEC)

РУССКИЙ

ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЛИБАКТЕРИОЗА У КРОЛИКОВ, ВЫЗВАННЫЕ ЭНТЕРОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИЕЙ *ESCHERICHIA COLI* (O15:H-)

В. Петров, М. Александров, С. Лазарова, М. Лютсканов

Слежены гистопатологические изменения на кишечном тракте только отлученных от матери кроликов с экспериментальной или спонтанной инфекцией бактерией *Escherichia coli* (O15:H-). Замечены значительные сокращения и утолщения хорошо эпителизованных кишечных язычков, на чьих верхах замечены богато колонизированные колIFORMные бактерии, после крашения по Вартин-Старый методу. Замечена патологическая схема представляет собой константные результаты у таких инфекций и могла бы употребиться как патологическая характеристика у дифференциального диагноза спонтанных синдромов диареи. Адгезия колибактерий на энтероциты, вместе с данными из бактериологических трудов (изоляция, идентификация, определение принадлежности O-серогруппе и биохимическое поведение) дало возможность определить, что изоляты принадлежат группе энтеропатогенной *E. coli* (EPEC). Более детальные диагностические процедуры, как ПЦР, могут совершиться только поскольку необходимо.

Ключевые слова: колИБАКТЕРИОЗ, энтеропатогенная *E. coli* (EPEC)

INFECTIONS WITH *EHRlichia CANIS* AND *BORRELIA BURGdorFERI* IN A DOG****INFEKCIJE BAKTERIJAMA EHRlichia CANIS I BORRELIA BURGdorFERI KOD JEDNOG PSA*****I. Tsachev, R. Simeonov, V. Petrov****

A clinical case of Ehrlichia canis and Borrelia burgdorferi infections in a 5-year-old male German Shepherd is described. Clinical, serological, necropsy and histopathological examinations supporting the diagnosis have been performed.

Key words: Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi, dog, necropsy findings, histopathological findings

Introduction / Uvod

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a tick-borne disease, caused by *Ehrlichia canis*. Ehrlichiae are Gram negative, obligate intracellular bacteria with a size of 0.5-1.5 μm . A principal vector of their distribution is the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* [1]. Recently published data from 2006 are unquestionably proving the zoonotic character of the disease, observed among people in Venezuela [2].

CME is nosogeographically related to Africa, Asia, the Middle East, Europe, North and South America. The data for its prevalence in the Mediterranean basin are as follows: Italy 13.5%, Greece 21.8%-41.2%, France 46.4%, Israel 63%, Spain 2.3-66.7%, Tunisia 72%, Turkey 74% [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

In Bulgaria, *Ehrlichia canis* was both clinically and serologically detected for the first time by Tsachev in a kennel near Plovdiv [13], and later retrospectively, in many regions in South and North Bulgaria – Stara Zagora, Yambol, Plovdiv, Burgas, Blagoevgrad, Silistra, Varna, Veliko Tarnovo, Pleven, Montana and Rousse [14,15].

Lyme borreliosis (LB) is a zoonotic tick-borne, naturally focal, multi-systemic disease with dermatological, neurological, cardiovascular, arthropathic

* Rad primljen za štampu 12. 7. 2007. godine

** Ilija Tsachev, R. Simeonov, Vladimir Petrov, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

and other manifestations. Ticks are vectors of the infection, and the principal transmitter is *Ixodes ricinus*. This tick species is widely distributed in Bulgaria and according to the data of Hristova *et al.*, 2003 [16] it is up to 20% infected with LB agents.

The etiological agent of borreliosis is *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex. On the basis of DNA/DNA hybridization, ribotyping and 16S ribosomal sequencing of isolates, the strains *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii* have been specified.

At present, borreliosis in humans and dogs is highly prevalent all over the world, including in Bulgaria. For 1990-2002, 3261 cases of diseased people in 26 regions have been reported [17]. For the region of Stara Zagora, the clinically recorded cases for 1998-2002 are 75 [18].

The scientific reports about the incidence of LB among dogs in Bulgaria are very few – only three. The first one describes a clinical case of erythematous form in an 8-year-old Boxer [19]. The authors isolated the causative agent, performed an antibiogram and treated the dog with amoxicillin and consequently – with doxycycline and sulphonamides. The second report was a seroepidemiological one and comprised a population of 106 dogs, 499 cows and 512 sheep from 13 regions, endemic for human LB. The results showed the highest seroprevalence in sheep (56.25%) followed by cows (54.31%) and the lowest in dogs – 22.6% [20]. In a study of 16 dogs using *ELISA*, Martinov *et al.*, 2006 [21], observed a significant result only in one dog whereas by indirect immunofluorescence – only 2 seropositive out of 46.

Materials and methods / Materijal i metode ispitivanja

In March 2005, a 5-year old, 30-kg German Shepherd named Buck, was referred to a clinic in Stara Zagora. The state of the dog was poor – enhanced heart rate, body temperature of 39.9 °C, adynamia, weakness, depression, apathy, tachypnea, dehydration, anorexia, myalgia, slightly enlarged popliteal lymph nodes, pale mucous coats and swelled hindlimbs. A 2-day therapy with glucose, vitamin C, novocaine, degan, dexamethasone and lincospectin was applied. No blood laboratory analysis was done.

Due to the lack of remission by the 3rd day, euthanasia was performed according to the owner's will. From the history it became clear that the dog lived in the settlement of Dve Mogili, a region of Stara Zagora, together with 2 other dogs. One year ago it was vaccinated against canine distemper, hepatitis, parvovirus, leptospirosis and rabies. Several times, ticks were observed on the dog's skin.

Prior to the euthanasia of Buck, blood for analysis was obtained in an EDTA-containing vacutainer and separately, in another vacutainer for blood serum separation. The other two dogs living in the same yard were also sampled. The following analyses in the blood serum were performed:

Monocytic ehrlichiosis, Lyme disease and dirofilariosis / Monocitna erlihioza, lajmska bolest i dirofilarioza. ELISA /IDEXX Snap® 3DX™ Test, USA was used. The result is qualitatively visualized (+/-), without detecting the antibody load. The diagnostic value of the used test was very high – specificity for all three diseases – 100%; sensitivity: for *E. canis* – 99%, for dirofilariosis – 98%; for *B. burgdorferi* – 92% [22, 23, 24].

Ehrlichiosis / Erlihioza. An indirect immunofluorescence technique /IFA/ was used [25], that is still a gold standard for ehrlichiosis [26]. A formal inactivated suspension ($2 \cdot 10^6$ /ml) of cells infected with *E. canis* (Synbiotics Europe, France) and monospecific rabbit anti-canine FITC- labeled IgG (Sigma, Germany) was used as the antigen. Serum working dilutions of 1:100 to 1:1600 were used, and the result was detected on an immunofluorescent microscope LOMO (x 200) (Fig. 1). Titres higher than 1/100 were accepted as significant [27].

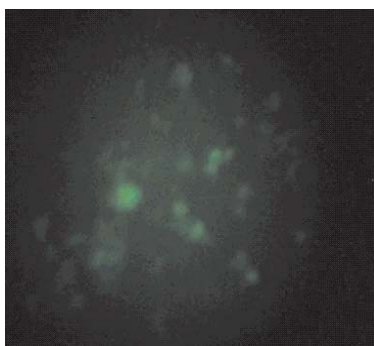


Figure 1. An indirect positive immunofluorescence
Slika 1. Indirektna pozitivna imunofluorescencija

Leptospirosis / Leptospiroza. An analysis for the presence of leptospirosis was done using the reaction of microagglutination-lysis (RMAL). Taking into consideration the current etiological image of the disease [28], apart from the conventional *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* and *L. tarassovi* were also included (Regional Diagnostic and Research Veterinary Institute, Stara Zagora). Titres of 1/100 were accepted as significant [29].

Blood smears were prepared from the EDTA blood and stained according to Romanovski-Giemsa.

After the euthanasia, a gross pathology examination was done and samples for histological study were obtained. The materials included mesenteric lymph nodes, spleen, stomach, ileum, urinary bladder and brain. Imprint preparations were prepared from lymph nodes and stained with Hemacolor®. The histological specimens were fixed in 10 % neutral formalin and embedded in paraffin,

cut on a paraffin microtome with a thickness of cross sections of 4 μm , and stained with haematoxylin/eosin (H/E).

Results / Rezultati

Serological results / Serološki rezultati. The *ELISA* testing of Buck showed the following results: (+) for ehrlichiosis, (+) for Lyme disease and (-) for dirofilariosis. The possibility to determine quantitatively the antibody titre in ehrlichiosis induced us to perform an IFA test, that yielded a titre of 1:800.

The testing for leptospirosis to *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* and *L. tarasovi* was negative (-) at 1:50. It was performed because leptospirosis was suspected on the basis of the observed weak icterus and the necroses of the tongue.

Of the other two dogs that lived together with Buck, one reacted positively for LB, whereas the other was LB-negative. Both dogs were negative for ehrlichiosis, dirofilariosis and leptospirosis.

The blood smears obtained from Buck and the other two dogs were negative for babesiosis and haemobartonellosis.

Gross pathology findings / Ukupni patološki nalazi. The inspection of the body revealed icteric visible mucous coats and hindlimb swellings. The peripheral lymph nodes were slightly enlarged. After dissection of body cavities, a marked haemorrhagic diathesis was observed. The haemorrhages (petechiae and ecchymoses) were primarily located on gastrointestinal, genitourinary and cardiac mucosae (Fig. 2). On the tongue's borders, symmetrical necroses were observed (Fig. 3). The lungs were oedematous, and the chest cavity – filled with about 0.5 L yellow-reddish fluid. The bronchial and mediastinal lymph nodes were



Figure 2. *The haemorrhages (petechiae and ecchymoses) on epicardial mucosae*
Slika 2. Hemoragije (petehije i ehimoze) na epikardijalnoj sluzokoži

slightly enlarged and reddened. The same alterations, but more severe, were observed in the mesenteric lymph nodes (Fig. 4). The spleen was enlarged and showed macroscopic signs of chronic venous hyperaemia (Fig. 5). The kidneys were significantly enlarged and spattered with spot-like haemorrhages (Fig. 6). The urinary bladder was with a distended wall and its mucous coat was with multiple petechial haemorrhages. After dissection of the skull, a marked venous hyperaemia of cerebral blood vessels was revealed.



Figure 3. *Tongue's borders - symmetrical necroses*
Slika 3. Rubovi jezika – simetrične nekroze



Figure 4. *Enlargement and reddening of mesenteric lymph nodes (Lymphadenitis simplex)*
Slika 4. Uvećanje i crvenilo mezenterijalnih limfnih žlezda (limfadenitis simpleks)



Figure 5. *Splenomegalia*
Slika 5. Splenomegalija



Figure 6. *Petechial haemorrhages on renal cortex*
Slika 6. Petehijalne hemoragije na renalnom korteksu

Histopathological findings / Histopatološki nalazi. The histological examination of the kidneys, liver and lymph nodes, showed a proliferation of lymphoreticular and plasmatic cells. In the spleen, multiple necrotic foci and siderocytes were observed. In the gastric and intestinal propria, epithelial cell desquamation, haemorrhages and infiltration with neutrophils were present. In the liver, centrilobular necroses and Kupffer cell activation were revealed. In the kidneys, haemorrhages, degeneration of epithelial cells of renal tubules and proliferation into renal glomerules, mainly from plasmatic cells were shown. Haemor-

rhages and mononuclear proliferation were also observed in the propria of the urinary bladder. Some areas of the lymph nodes and the spleen were necrotic. The brain hemispheres revealed vascular hyperaemia, oedema and lymphocytic-plasmatic proliferations.

Discussion / Diskusija

Cases of mixed infection with zoonotic agents in the dog, especially with vector-borne ones, have been present for a long time, but are very few [30]. Data from Israel showed 73% co-infections with more than three transmissible agents: *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Borelia burgdorferi*, *Bartonella visonii* [7]. It was established that 85% of dogs with hepatozoonosis were seropositive for *E. canis* as well; there is also evidence for cases of co-infections with *Ehrlichia platys*, *Borrelia burgdorferi* and *Leishmania infantum* [31, 32, 34]. Studies on leptospirosis and leishmaniasis performed in Greece, also have shown mixed infections – occult and clinical [29]. The latest information reports a certain increase in the prevalence of vector-borne infections [34].

The percentage of ixodid ticks, infected with *Borrelia* and *Ehrlichia* is relatively low, varying from <1% to 6% [35]. Experimental studies in mice showed that these agents were transmitted independently one from the other [36]. The Lyme borreliosis and the human granulocytic ehrlichiosis is a rarely seen combination – they accounted for 3-15% of tick-borne infections in Connecticut and Wisconsin [37]. The serological data from the *ELISA* and *IFA* tests showed an infection with *E. Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi*, that could be prior or current.

It is known that 50-90% of animals, seropositive for LB, are asymptomatic. Less than 5% manifest clinical signs of the disease. During the acute phase, fever, lethargy, lymphadenopathy, lameness, are most commonly exhibited. In our patient, no lameness was observed.

The clinical signs in ehrlichiosis is more various, but the fever, depression, lethargy, anorexia, weight loss, pale mucosae, hindlimb swellings, are all accompanying signs [38]. Ecchymoses on mucous coats could also be present and were observed by us as well. The region of origin of Buck and the other two dogs (Stara Zagora region) was with a proved 15% seroprevalence of *E. canis* [14].

According to most investigators, the most important gross pathology finding in ehrlichiosis was the enlargement of the spleen and the liver, the gastrointestinal and genitourinary haemorrhages and pulmonary oedema [33, 39, 40, 41, 42]. The same changes could be observed in LB, but very frequently, arthritis, uveitis, myocarditis could also be present; and in cases of generalized infection – dermatitis as well [23, 43, 44, 45]. The petechial bleedings in kidneys, hepatic necroses and lymph nodes' and splenic enlargements were more characteristic for the acute form of leptospirosis, whereas the uraemic syndrome was more typical for the chronic course of the disease due to the developing interstitial nephritis [46, 47]. The similar pathoanatomical and histopathological findings in these dis-

eases makes their exact diagnostics difficult, thus necessitating the use of other laboratory diagnostic methods.

Our clinical, epizootological, serological, pathoanatomical and histopathological data allowed us to diagnose monocytic ehrlichiosis. The serological results showed also a *Borrelia burgdorferi* infection. It could not be said for sure whether it was current or prior, because no attempts at isolation or PCR were performed. We assume that in this case, a carrier was more likely present, because *Borrelia burgdorferi* antibodies were also present in one of the two dogs that lived together with the patient, without clinical signs of the disease.

Tick-borne infections in both men and animals are endemic for many regions of the world, including Bulgaria. The continuously appearing new data showed that these diseases are widely distributed all over the world and because of this, are systematically and thoroughly studied. The correct identification of the detailed etiological study of their reservoirs and vectors, would result in a more successful control of their prevalence.

References / Literatura

1. Tsachev I.: Canine monocytic ehrlichiosis – etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical findings. *Vetmed news*, 7/8, 18-22, 2003 (in BG). - 2. Perez M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q, Rikihisa Y.: Human Infection with *Ehrlichia canis* Accompanied By Clinical Signs In Venezuela, *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 110-111, 2006. - 3. Cuteri V., Mezzasoma P., Moskati L., Battistacci L., Falcone R., Priori P., Pieramati C., Valente C.: Ehrlichia canis : serological survey in dog. *Veterinaria (Cremona)* 16, 3, 69-74, 2002. - 4. Kontos V.: Aksiologisi efarmostenton metrion prolipsis ton zooantroponoson me epidemiologiki erevna sto nomo Evrou. In: Kiroopoulos G. (Ed.) : *Ygeiovomiki tautotita tis diasunoriakis gramis. Parilipsis erevnon ke meleton ya ti dimosia ugia sto nomo Evrou*. INTERREG II. 77-92, 2001 (in Gr). - 5. Jansen J., Muller E.: Dauschies. Arthropod-borne diseases in Greece and their relevance for pet tourism. *Practiche Tierarzt* 84, 6, 432-438, 2003. - 6. Bugnet F, Latour S, Chenal L, Malvert B, Viallard J.: Seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis on Reunion. *Vet Rec* 150, 20, 636-637, 2002. - 7. Baneth G., Breitschwerdt E., Hegarty B., Pappalardo B., Ryan J.: A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet Parasitol*, 74, 133-142, 1998. - 8. Saintz A., Tesouro M., Rodrigueguez F., Mayoral I., Mazzucchelli F.: Seroprevalence of Ehrlichia canis infections in police dogs in Spain. *Prev Vet Med*, 23, 179-182, 1994. - 9. Saintz S., Delgado., Amusatogui I., Tesouro M., Carmenes P.: Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Casdtilla-Leon (north-west Spain). *Prev. Vet. Med*, 29, 1-7, 1996. - 10. Brouqui P, Davoust B., Haddad S.: Serological evaluation of Ehrlichia canis infections in military dogs in Afrika and Reunion Island. *Vet Microbiol*, 26, 103-105, 1991. - 11. Davoust B.: Epidemiology of dog ehrlichiosis, leishmaniasis and dirofilariasis: actual situation in population of the french army. *Rev Med Vet*, 145, 4, 249-256, 1994. - 12. Arda A., Erdeger J., Atasaven L., Kurt A.: Serological survey for Ehrlichia canis in dogs from the Mediterrean coast of Turkey. Abstracts 27 Congress WSAVA, Granada, 2002, <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings>. - 13. Tsachev I.: Detection of Antibodies Reactive with Ehrlichia canis in a Kennel in Bulgaria, *Turk J Vet Anim Sci.*, 30, 425-426, 2006. - 14. Tsachev I., Kontos V., Zarkov I., Krastev S.: Syrvey of antibodies reactive with *Ehrlichia canis* among dogs in South Bulgaria. *Rev Med Vet*, 157,10, 481-485, 2006. - 15. Tsachev I., Papadajonakis E., Kontos V., Zarkov I., Petrov V., Pelagic V.: Seroprevalence of Ehrlichia canis infection among privately-owned dogs in northern Bulgaria. *Journal oh the Hellenic*

Vet Med Society, 57, 3, 212-216, 2006. - 16. Hristova I., Taseva E., Van de Pol I., Schouls L.: Borreliæ, Ehrlichiae and Rickettiæ in Bulgarian Ixodes Ricinus Ticks. *Infectology*, XL, 1, 19-22, 2003 (in BG). - 17. Draganov P., Monev V., Novkirishki V., Ribarova N., Dimitrova T., Grozev A., Milanov K., Doicheva V., Nikilov D., Voinova V., Miteva I., Gotev N.: Zoonoses in last 10-15 years in Bulgaria. Proceedings of National Geographical Society, Sofia, 2004 (in BG). - 18. Piperova V., Karaboideva: Prevalence of Lyme in Stara Zagora county -1998-2002. National Congress of Infectious diseases, Epidemiology and Parasitology. Proceedings, 56, 2003 (in BG). - 19. Popova T., Kamenov S.: Erythematous form of Lyme disease in dog. *Veterinary Medicine*, 4, 3-4, 1998 (in BG). - 20. Zarkov I., Marinov M.: The Lyme disease: results of a serological study in sheep, cows and dogs in Bulgaria. *Rev Med Vet*, 154, 5, 363-366, 2003. - 21. Martinov S., Halacheva M., Nedelchev N., Aleksandrov E.: Contemporary state of the tick-borne transmissible infections in domestic animals in Bulgaria. *Veterinary Medicine*, X, 3-4, 7-18, 2006 (in BG). - 22. Steere A. C.: Lyme Disease. *New Engl J Med*, 321, 9, 586-595, 1989. - 23. Greene R. T.: Lyme Boreliosis. In Greene, C.E. (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, W.B.Saunders Company, 508-514, 1990. - 24. Rikihisa Y.: The Tribe Ehrlichia and Ehrlichia Diseases. *Clin Micro Rev*, 4, 3, 286-308, 1991. - 25. Ristic M., Huxsoll D. L., Weisiger R. M., Hildebrandt P. K., Nyindo M. B. A.: Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect Immun.*, 6, 226-231, 1972. - 26. Aguirre E., Ayllón T., Sainz A., Amusatogui I., Tesouro M. A.: Indirect Fluorescent Antibody Test in Canine Ehrlichiosis: A Comparative Study Using Different Strains of *Ehrlichia canis* as Antigen. 14th ECVIM-CA Congress, <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings>, 2004. - 27. Mylonakis M., Kutinas A., Billinis C., Leontides L., Kontos V., Papadopoulos O., Rallis T., Futianou A.: Evaluation of cytology in diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol*, 91, 197-204, 2003. - 28. Tsachev I.: Canine Leptospirosis. *Vetmed news*, 9-10, 10-15, 2004. - 29. Butsini S., Patakakis M., Burriel A. R., Konthos B.: Serologic evidence of mixed infection involving the zoonoses leishmaniasis and leptospirosis in greek dogs. *Microbiologika*, 25, 1-8, 2002. - 30. Levy S.: Tick Biology and Tick-Borne Diseases for the Small Animal Practitioner Western Veterinary Conference, Abstract, 2003. - 31. Du Plessist J., Fourie N., Nel P., Evezard D.: Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in the dog: Blood smear examination supplemented by the indirect fluorescent antibody test, using *Cowdria ruminantium* as antigen. *Onderstepoort J Vet Res* 57, 151-155, 1990. - 32. Kontos V., Athanasiou L.: Use of Enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis. *Canine Practice* 23, 3, 10-14, 1998. - 33. Waner T., Harrus S.: Canine monocytic ehrlichiosis. In: Carmichael L, ed. *Recent Advances in canine infectious diseases*. New York: International Veterinary Information Service, Document No A0108.0400, 2000. - 34. Sainz A., Villaescusa A., Rodriguez-Franco F., Aguirre E., Amusatogui I., Tesouro M. A.: Canine Ehrlichiosis: A Retrospective Study of Concurrence with Other Diseases 14th ECVIM-CA Congress, <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings>, 2004. - 35. Belongia E.: Epidemiology and impact of coinfection acquired from Ixodees ticks, *Vector Borne Dis.*, 2, 4, 265-273, Winter, 2002. - 36. Levin M., Ffich D.: Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes ricinus* ticks. *Infect Immun*, 68, 2183-2186, 2000. - 37. Mathiesen D., Oliver J., Kolbert C. *et al.*: Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the Unated States. *J Infect Dis*, 175, 98-107, 1997. - 38. Tsachev I.: Canine monocytic ehrlichiosis – diagnosis, therapy, control. *Vetmed news*, 9-10, 14-17, 2003. - 39. Ettinger S., Feldman E.: eds. *Text book of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1, 378-381, 626, 1995. - 40. Harrus S., Kass P., Klement E., Waner T.: Canine Monocytic Ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec*, 141, 360-363, 1997. - 41. Hildebrandt P., Huxsoll D., Walker J., Nims R., Taylor R., Andrews M.: Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res*, 34, 1309-1320, 1973. - 42. Jubb K., Kennedy P., Palmer N.: Pathology of domestic animals. 4th ed. New York: Academic Press

Inc, 3, 195-196, 1993. - 43. Duray P.: Clinical pathologic correlation of Lyme disease. *Rev Infect Dis*, 6: 1487-1493, 1989. - 44. Grauer G., Burgess E., Cooley A. Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 193, 237-239, 1988. - 45. Roush J., Manley P., Dueland R.: Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 195, 951-953, 1989. - 46. Jones T., Hunt R., King N.: *Veterinary pathology*, 6th ed., eds. Jones T., Hunt R., King N., Pennsylvania, 1994. - 47. Thiermann A.: Canine leptospirosis in Detroit. *Am J Vet Res*, 41, 1659-1661, 1980.

SRPSKI

ИНФЕКЦИЈЕ БАКТЕРИЈАМА *Ehrlichia canis* I *Borrelia burgdorferi* КОД ЈЕДНОГ ПСА

I. Tsachev, R. Simeonov, V. Petrov

Opisan je klinički slučaj infekcije bakterijama *Ehrlichia canis* i *Borrelia burgdorferi* kod 5-godišnjeg Nemačkog ovčara. Izvršena su klinička, serološka i histopatološka ispitivanja, kao i nekropsija koji potvrđuju dijagnozu.

Ključne reči: *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, pas, nalazi nekropsije, histopatološki nalazi

РУССКИЙ

ИНФЕКЦИИ БАКТЕРИЯМИ *Ehrlichia canis* и *Borrelia burgdorferi* У ОДНОЙ СОБАКИ

И. Тсахев, Р. Симеонов, В. Петров

Описан клинический случай инфекции бактериями *Ehrlichia canis* и *Borrelia burgdorferi* у 5-летней Немецкой овчарки. Совершены клинические, серологические и гистологические испытания, словно и некрупсия, которые подтверждают диагноз.

Ключевые слова: *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, собака, результаты некрупсии, гистопатологические результаты

**ETIOLOGICAL, CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL
INVESTIGATIONS OF DERMATOPHYTOSIS AMONG PETS
IN THE REGION OF STARA ZAGORA FOR THE PERIOD
2004-2006***

***ETIOLOŠKA I KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA
PRISUSTVA DERMATOFITA KOD KUĆNIH LJUBIMACA U REGIONU
STARA ZAGORA U PERIODU 2004-2006. GODINE***

G. Michaylov, I. Tsachev, V. Petrov**

The etiological structure of dermatophytoses in pets (dogs and cats) was analyzed using routine mycological techniques. For this purpose, 268 specimens obtained from both dogs and cats with suspected dermatophytoses were investigated. The specimens included crusts, hairs and injured tissues of skin lesions.

The mycological study comprised a native microscopy and inoculation on specific nutrient media followed by isolation and species identification.

A retrospective analysis was performed on the basis of history, clinical symptoms and the mycological studies. It was found that the presence of positive samples in dogs and cats was 18.6% and 13.2%, respectively.

*Most commonly, *Microsporum canis* was isolated in 92.3% of canine and 100% of feline specimens. It was also found that animals aged under 1 year were more susceptible to the examined mycological infections. No significant gender-dependent differences have been observed.*

*Key words: Dermatophytoses, *M. canis*, susceptibility, dogs, cats*

Introduction / Uvod

Dermatophytoses are superficial fungal infections, affecting the keratin tissues (nails, hair) and the horny layer (*Stratum corneum*) of the skin. The

* Rad primljen za štampu 12. 7. 2007. godine

** Gosho Michaylov, Ilija Tsachev, Vladimir Petrov, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

fungi, causing these infections in animals, are known as dermatophytes and belong to the *Microsporum* and *Trichophyton* genera. Depending on the main hosts and the natural areal, the various species of both genera are classified as zoophilic, anthropophilic and geophilic. Zoophilic species are always pathogenic for animals, but a large part of them affect people as well. Anthropophilic species infect humans and, more rarely, animals. Geophilic species inhabit the soil and serve as a reservoir of infection for both humans and animals. More than 20 dermatophyte species are described as causing dermatophytosis in cats and dogs [13]. The principal agents are *M. canis*, *M. gypseum* and *T. mentagrophytes* [5, 14]. In over 95% of cases in cats, *M. canis* was found to cause dermatophytosis [10]. Although this organism is not a natural resident of the feline hair coat [8], it is believed that cats are a natural reservoir for it [10, 14]. In dogs, the percentage of dermatophytoses varies from 4 to 10% [14], but some studies report a higher prevalence [2, 11]. In cats, dermatophytosis is encountered almost twice as many times [14]. The prevalence of dermatophytosis varies according to the climate, the temperature, the humidity, the rearing, the presence of natural reservoirs of infection [6].

Young animals and especially these under 1 year of age are more frequently affected [6, 3].

The aim of the present study was to determine the etiological structure and some epidemiological parameters of dermatophytosis among dogs and cats in the region of Stara Zagora.

Materials and methods / Materijal i metode ispitivanja

Animals / Životinje

For a 2-year period (March 2004 – April 2006) clinical samples were obtained from 268 animals (224 from dogs and 44 from cats) with tentative diagnosis of dermatophytosis and analyzed in our laboratory. The samples were obtained from animals referred to the Clinic of Infectious Diseases or sent by private veterinarians. For each case, the history, clinical signs, age, gender, breed and way of rearing were recorded.

Specimen collection / Sakupljanje uzoraka

The specimens were collected by obtaining epidermal skin scrapes and hairs at the boundary of skin lesions. The sampling areas were previously treated with 70% ethanol. The specimens sent by private veterinary clinics were placed in individual sterile plastic containers.

Laboratory methods / Laboratorijske metode

1. microscopic examination

All samples were studied for the presence of fungi by direct microscopy in 20% NaOH solution. Taking into consideration that the arthrospores of

zoophilic dermatophytes were from the ectothrix type, a part of specimens were studied in paraffin.

2. cultural investigations

For cultivation, 3 types of nutrient media were used: Sabouraud's dextrose agar (Difco), Mycosel agar (Difco) and DTM (Difco). All three media contained cycloheximide (0.5 mg/ml) and chloramphenicol (0.05 mg/ml). The specimens were inoculated in standard Petri's dishes at 27°C for 3 weeks.

The species identification of isolates was done on the basis of macro- and micromorphological traits according to Tilton and McGinnis (1987); Rippon (1988).

Statistical analysis / Statističke analize

The data were statistically processed using the χ^2 test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results / Rezultati

The investigation included 224 dogs and 44 cats with clinical signs, specific for dermatophytosis. Forty eight animals (17.9%) were positive for dermatophytosis. Dermatophytes were isolated in 42 out of the 224 canine (18.6%) and 6 out of the 44 (13.6%) feline samples (Table 1).

Table 1. Results from microscopy and microbial culturing of samples /
Tabela 1. Rezultati mikroskopske analize i mikrobialne kultivacije uzoraka

	Male / <i>Mužjaci</i>	Female / <i>Ženke</i>	Total / <i>Ukupno</i>	Microscopy / <i>Mikroskopija</i>		Microbial culturing / <i>Mikrobialna kultivacija</i>	
				Number of samples / <i>Broj uzoraka</i>	%	Number of samples / <i>Broj uzoraka</i>	%
Dogs / <i>Psi</i>	108	116	224	48	21.4	42	18.6
<1 year / <i><1 godine</i>	47	37	84	31	26.0	31	26.0
>1 year / <i>>1 godine</i>	65	77	142	9	12.7	11	15.6
Cats / <i>Mačke</i>	18	26	44	8	18.2	6	13.6
<1 year / <i><1 godine</i>	8	10	18	3	16.6	4	22.2
>1 year / <i>>1 godine</i>	11	15	26	2	7.6	2	7.6

The table shows that the prevalence of dermatophytes in animals younger than 1 year of age was higher ($P < 0.001$). Table 2 presents the seasonal distribution of studied specimens.

Table 2. Seasonal distribution of studied specimens
Tabela 2. Raspored ispitivanih uzoraka po godišnjim dobima

	Spring / <i>Proleće</i>		Summer / <i>Leto</i>		Autumn / <i>Jesen</i>		Winter / <i>Zima</i>	
	Number of samples	%	Number of samples	%	Number of samples	%	Number of samples	%
<i>Dogs / Psi</i>								
Total number of samples / <i>Ukupan broj uzoraka</i>	56	25	45	20	62	27,6	61	27,4
Positive after culturing / <i>Pozitivni posle kultivacije</i>	9	16	8	17,7	15	24,2	10	16,3
<i>Cats / Mačke</i>								
Total number of samples / <i>Ukupan broj uzoraka</i>	9	20,4	8	18,1	13	29,5	14	32
Positive after culturing / <i>Pozitivni posle kultivacije</i>	1	11,1	1	12,5	2	15,3	2	14,2

No statistically significant differences were observed with regard to positive results, but the highest percentage of positive samples was established in October and November. *M.canis* was present in 92.3% of canine and 100% of feline samples. In the other canine samples, *T. mentagrophytes* was recovered.

Discussion / Diskusija

Investigations on dermatophytosis have been performed in many countries all over the world: *ì.canis*, *Ò.mentagrophytes* and *M.gypseum* are reported as principal etiological agents in dogs and cats [8, 7, 14]. In our studies, we observed *M.canis* and *Tr.mentagrophytes* in dogs and only *M.canis* in cats. These data are in accordance with results obtained in the United Kingdom, where *M.canis* and *Tr.mentagrophytes* together account for about 95% if isolates [14].

In the present study, the percentage of positive results for all studied patients with tentative diagnosis of dermatophytosis, was 17.9%. similar results are reported in the UK [14], Brazil [2]. The percentage of positive samples among dogs was 18.6%. This is in disagreement with available literature data, where this percentage ranged between 4 and 10%. In dogs, compared to cats, the prevalence of dermatophytosis is lower [4, 12]. This could be explained by the fact that cats are kept individually as pets. Only in one case, where 3 cats shared the same house, the disease was observed in all three after contact with stray cats. Moreover, the infection was also discovered in the owner (Fig.1).

All these observations point out that stray cats are a natural reservoir of the infection [9] and that *M.canis* is a highly contagious and infectious agent.

There are no statistically significant data about the gender- and breed-related susceptibility, but the incipience of the diseases in animals younger than 1 year is indicative. The high sensitivity of adolescent animals to the infection could be probably due to immune-related factors.



Figure 1a. *M. canis* infection in dog /
Slika 1a. Infekcija *M. canis* kod psa



Figure 1b. *M. canis* infection in cat /
Slika 1b. Infekcija *M. canis* kod mačke

There were no statistically significant data about the seasonal incidence of these infections, but the percentage of positive samples was higher in October and November. This was probably related to recent climatic changes in our country.

The clinical signs are various and include the typical circular skin lesions with erythema, desquamation, hair loss with a marked demarcation line (Fig. 2), as well as the involvement of diffuse areas with signs of squamous dermatitis and partial hair loss. That is why, laboratory methods are essential for the



Figure 2a. *M. canis* infection in twenty five old woman /
Slika 2a. Infekcija *M. canis* kod dvadesetpetogodišnje žene



Figure 2b. *M. canis* infection in twenty five old woman /
Slika 2b. Infekcija *M. canis* kod dvadesetpetogodišnje žene

proper diagnosis. The analysis of data from the microscopy and the microbial culturing showed more positive results in the first method– 48 vs 42 in dogs and 8 vs 6 in cats, respectively.

Various artifacts could yield false positive results throughout the microscopic investigation, and that is why, by now, the microbial culturing is a "gold standard". On the other hand, some saprophytic fungi such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* etc. (Fig. 3) grow faster and could be responsible for false negative results. Therefore, an exact diagnosis necessitates their combined use.

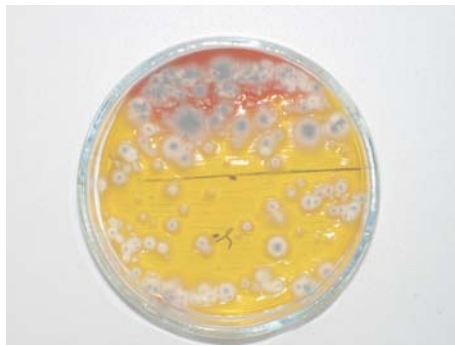


Figure 3a. Fungal colonies of saprophytic fungus - six day *Aspergillus* on DTM agar
Slika 3a. Kolonije saprofitnih gljivica - šesti dan kulture *Aspergillus* na DTM agaru

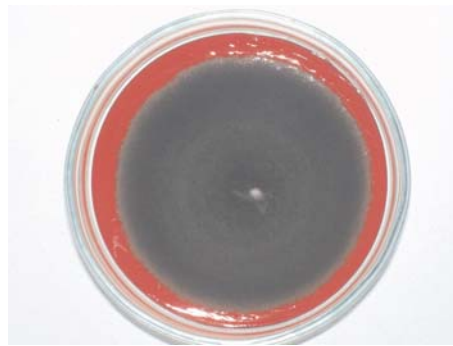


Figure 3b. Fungal colonies of saprophytic fungus - seven day culture of *Penicillium* on DTM agar
Slika 3b. Kolonije saprofitnih gljivica - sedmi dan kulture *Penicillium* na DTM agaru

References / Literatura

1. Biberstein E.L.: Dermatophytes. In: Review of Veterinary Microbiology. Eds E.L. Biberstein and Y.C.Zee.. Blackwell Scientific Publications, Boston, 272-285, 1990.
2. Brillhante R. S. N. *et al.*: High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytosis in Northeast Brazil; Epidemiological and diagnostic features, *Mycopathologia*, 156, 303-308, 2003.
3. Cafarchia C., Romito D., Sasanelli M., Lia R., Capelli G., Otranto D.: The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses*, 47, 11-12, 508-513, 2004.
4. Caretta G., Mancianti F., Ajello L.: Dermatophytes and keratinophilic fungi in cats and dogs. *Mycoses*, 32, 620-626, 1989.
5. Levis D. C. *et al.*: Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University, 1981-1990. *Vet Dermatol* 2, 51, 1991.
6. Mancianti F., Nardoni S., Cecci S., Corazza M., Taccini F.: Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. *Mycopathologia*, 156, 16, 13-18, 2002.
7. Marchisio V. F., Gallo M. G., Tullio V.: Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs in Turin, Italy, *Mycoses*, 38, 239-244, 1995.
8. Moriello K. A., De Boer D.J.: Fungal flora of the coat pet cats. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 602-606, 1991a.
9. Moriello K. A.: Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Vet. Dermatol*, 15, 2, 99-1007, 2004.

- 10. Muller G. H., Kirk R. A., Scott D. W.: Fungal diseases. In: Small Animal Dermatology, 4th edn. W.B. Saunders, Philadelphia, 295-346, 1989. - 11. Pinter L.: Epidemiological and clinical features of dermatophytoses in dogs and cats in Croatia between 1990 and 1998. Veterinarski Archiv 69, 5, 261-270, 1999. - 12. Romano C., Valenti L., Barbara R.: Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. Mycoses, 40, 471-472, 1997. - 13. Scott D. W., Miller W. H., Griffin C. E.: Muller and Kirk's Small Dermatology, 6th edn. Philadelphia; W.B.Saunders, 340, 2001. - 14. Sparkers A. H.: Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom. Vet Rec. 133, 57, 1994.

SRPSKI

ETIOLOŠKA I KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA PRISUSTVA DERMATOFITA KOD KUĆNIH LJUBIMACA U REGIONU STARA ZAGORA U PERIODU 2004-2006 GODINE

G. Michaylov G, I. Tsachev, V. Petrov

Istraživanje je obuhvatilo analizu prisustva dermatofita kod kućnih ljubimaca (pasa i mačaka) korišćenjem standardnih mikoloških tehnika. Ispitano je ukupno 268 uzoraka pasa i mačaka sa sumnjom na prisustvo dermatofita. Korišćeni su uzorci dlake životinja, kraste, kao i promenjena mesta na koži. Urađen je nativan mikroskopski pregled, a korišćene su i hranljive podloge u cilju identifikacije i izolacije uzročnika. Uzevši u obzir kliničke simptome, istoriju bolesti kao i pomenuta mikološka ispitivanja, utvrđeno je da su 18,6% ispitivanih pasa i mačaka bili pozitivni i 13,2% sumnjivi. *Microsporum canis* je izolovan iz 92,3% psećih i 100% uzoraka mačaka. Ustanovljeno je da su životinje mlađe od godinu dana bile prijemljivije na infekciju, dok razlike u polovima nisu imale značaja za istraživanje.

Ključne reči: dermatofitoza, *M.canis*, psi, mačke

РУССКИЙ

ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИСУТСТВИЯ ДЕРМАТОФИТОВ У ДОМАШНИХ ЛЮБИМЦЕВ В РЕГИОНЕ СТАРАЯ ЗАГОРА В ПЕРИОДЕ 2004-2006 ГОДА

G. Michaylov G, I. Tsachev, V. Petrov

Исследование охватило анализ присутствия дерматофитов у домашних любимцев (собак и кошек) пользованием стандартных микологических техник. Нами испытано совокупно 268 образчиков собак и кошек с сомнением на присутствие дерматофитов. Пользованы образчики шерсти животных, коросты, словно и изменённые места на коже. Сделан нативный микроскопический осмотр, а использованы и питательные среды с целью идентификации и изоляции возбудителя. Приняв во внимание клинические симптомы, историю болезни словно и упомянутые микологические испытания, утверждено нами, что 18,6% испытанных собак и кошек были положительные и 13,2% сомнительные. *Microsporum canis* изолирован из

92,3% собачьих и 100% образчиков кошек. Нами установлено, что животные моложе одного года были более приемлемые на инфекцию, пока разницы в полах не имели значения для исследования.

Ключевые слова: дерматофитоз, *M. canis*, собаки, кошки

**ETHIOLOGICAL STRUCTURE AND EPIDEMIOLOGICAL
MONITORING OF BACTERIAL INFECTIONS IN
INDUSTRIALLY REARED BIRDS IN BULGARIA***
*ETIOLOŠKA SRUKTURA I EPIDEMIOLOŠKI NADZOR BAKTERIJSKIH
INFEKCIJA KOD INDUSTRIJSKI GAJENE ŽIVINE U BUGARSKOJ*

Valentina Urumova, M. Lyutskanov**

The study was performed on the 9 largest poultry farms and hatcheries in Bulgaria during the period from 2001 to 2006.

Eight hundred thirty three samples from birds have been investigated – seven hundred ten from gallinaceous and one hundred twenty three from waterfowl. The samples have been taken from corpse material (liver, spleen, joint, air sack, small intestine) as well from dead embryo, cloacal and nasal swabs. They were analyzed using routine laboratory or the semi-automatic system of identification CRYSTAL for enterobacteriae and staphylococci, as well as using the API-20 NE system for nonfermentative bacteria.

A positive microbial finding was current in 67.8% of samples from dead chick embryos. The isolates belong to 13 different microbial species. A total of 14 species were isolated from the corpse material, nasal and cloacal swabs. Their specific presence is age dependent. Similar results have been found for waterfowl.

Key words: ethiology, bacterial diseases, reared birds, routine methods, diagnostic

Introduction / Uvod

Bacterial diseases account for a considerable share of infectious pathology in intensively reared birds. Their successful control requires a profound knowledge of their etiological structure, especially the dynamics, as well as their

* Rad primljen za štampu 12. 7. 2007. godine

** Valentina Urumova, Mihni Lyutskanov, Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

epidemiological features. For some microbial species there is a real problem of establishing routine methods of diagnostics.

The aim of the present study was to elucidate the etiological structure and the dynamics of manifestation of different bacterial infections in industrially reared birds – poultry and waterfowl, in some of the big farms in Bulgaria with regard to the optimization of prevention and control procedures.

Materials and methods / Materijal i metode ispitivanja

The epidemiological studies were performed on 9 farms – 6 poultry farms and 3 waterfowl farms using various rearing technologies.

A total of 833 samples were analyzed, including 710 from gallinaeous birds and 123 from waterfowl. The samples were obtained from dead embryos, from newly hatched chickens and ducklings, as well as from growing birds at a different age in order to monitor the dynamics of the etiological structure.

In order to determine the etiological factor, bacteriological investigations were carried out in samples as follows:

- Dead embryo samples – every sample covered 12 embryos; lung tissues and air sack.

- Corpse material samples – every sample covered 6 corpses.

From each corpse ventricle blood, liver, spleen, marrow, and in case of arthritis a joint sample were investigated. Lung tissue samples and air sack samples were taken in case of indication of mycoplasma. Lung tissue samples were taken in case of indication of ornitobacteria. Small intestine samples were investigated in case of indication of clostridia.

Bacteriological investigations also included:

- Cloacal samples received from chickens and fowls originating from the same farms.

The samples were bacteriologically analyzed using routine laboratory techniques for isolation, identification and typization. A part of the microbial isolates were identified by the semi-automatic system of identification CRYSTAL for enterobacteriae and staphylococci, as well as via using API-20 NE system.

Results / Rezultati

The bacteriological analysis of 355 samples from dead chick embryos revealed a positive microbial finding in 241 (67.8%) samples whereas no bacteria were present in 32.3 % of samples.

The obtained isolates included representatives of 13 microbial species (Fig. 1). Most commonly, representatives of the *Enterobacteriaceae* family, headed by *Escherichia coli* (23.2%) were isolated from dead chick embryos. This

was valid for all surveyed flocks. The second prevalence was that of the *Proteus* genus (16.1%). Members of *Enterobacter* spp. were found in 5.7% of samples. The other enterobacteriae included *Klebsiella* spp. and *Citrobacter* spp.

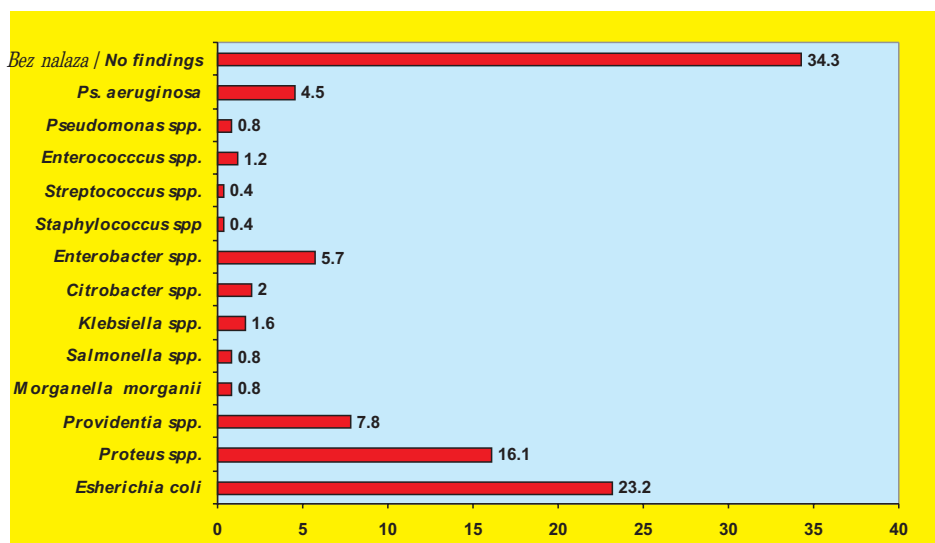


Figure 1. Percentages of bacterial isolates from dead chick embryos originating from 5 flocks (farms) /

Slika 1. Procenat bakterijskih izolata kod uginulih embriona pilića koji potiču od 5 zapata (farmi)

Gram positive cocci (staphylococci, streptococci and enterococci) were recovered relatively rarely – only in single samples.

Ps. aeruginosa isolates were detected considerably more frequently – this organism was evidenced in 4.5% of samples.

*Bacteriological findings in newly hatched broiler chickens (0-10 days of age) /
Bakteriološki nalaz kod tek izleglih brojler pilića (starosti 0-10 dana)*

The bacteriological investigations of 171 carcasses of broilers chickens at the age of 1 - 10 days, originating from 5 different farms, yielded findings including members of 9 various microbial species, shown on the figure 2.

Again, in newly hatched chickens, *Esherichia coli* was detected in 36.8% of studied samples. Similarly to the picture with chick embryos, the second place was held by representatives of the *Proteus* genus (16.8%).

The third prevalence was that of *Salmonella* spp. representatives, observed in 7.0% of samples. As the cause of death in newly hatched broiler chickens, members of *Enterobacter* spp. and *Ps. aeruginosa*, were next detected in 4.7% and 4.1% respectively if studied carcasses, but not in all studied batches.

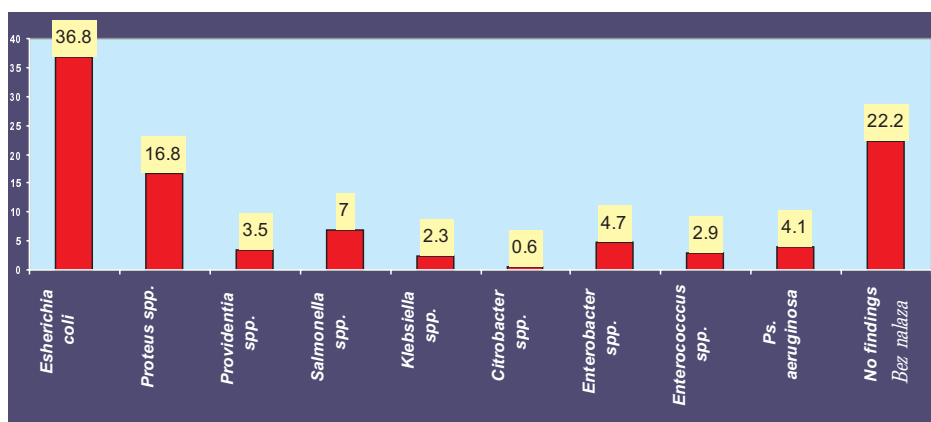


Figure 2. / Slika 2.

*Bacteriological findings in broiler chickens at the age of 10 - 30 days /
Bakteriološki nalaz kod brojler pilića starih 10-30 dana*

With the increase of age, the relative proportion of samples with a positive bacterial finding decreased. Sterile samples accounted for 72.9%. The microbial isolates in the other 27.1% consisted of representatives of 6 species. The most commonly isolated species in this age group was again *E. coli*, present in 20.6% of studied samples.

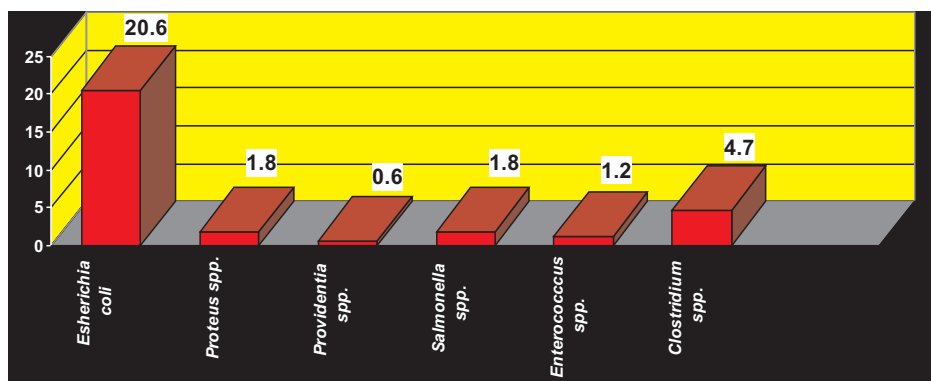


Figure 3. Percentages of bacterial isolates from dead broiler chickens at the age of 10-30 days /

Slika 3. Procenat bakterijskih izolata kod uginulih brojler pilića starih 10-30 dana

An interesting finding in this age group was the detection of anaerobic bacteria from the *Clostridium* genus (4.7%). In this case, there was an outbreak of necrotic enteritis in 3 different batches in one farm and in a single batch from another farm. The other microbial species, including the salmonellae observed in 3 carcasses from one farm, could be considered as accidental.

*Bacteriological findings in broiler chickens older than 30 days /
Bakteriološki nalaz kod brojler pilića starijih od 30 dana*

In broiler chickens older than 30 days, the species diversity of bacteria continued to decrease. Four microbial species were evidenced, among them *Mycoplasma* spp. This was the typical age for infection of birds with mycoplasmae and as expected, they were associated with colibacteria.

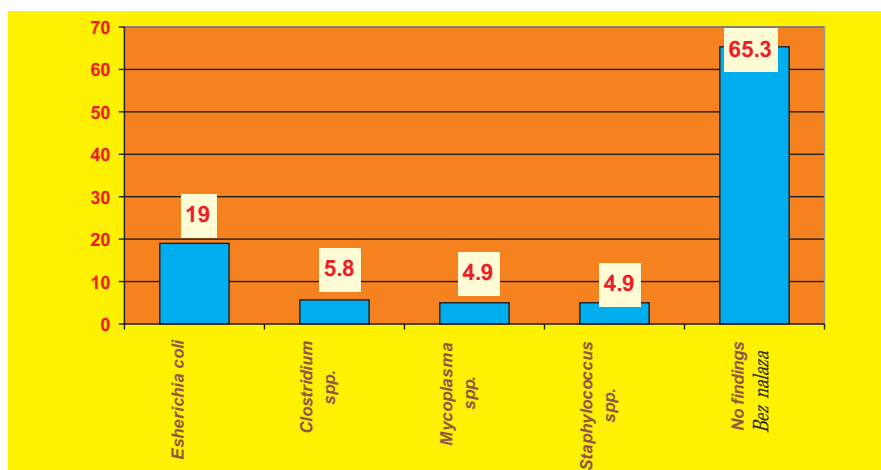


Figure 4. Percentages of bacterial isolates from dead broiler chickens older than 30 days /
Slika 4. Procenat bakterijskih izolata kod uginulih brojler pilića starijih od 30 dana

*Bacteriological findings in newly hatched ducklings (0-7 days of age) /
Bakteriološki nalaz kod tek izleglih pačića (starosti 0-7 dana)*

The bacteriological analysis of samples obtained from dead ducklings during the first 7 post hatching days showed isolates belonging to 7 microbial species (Fig. 5).

It could be seen that 55.6% of carcasses contained bacteria that could be determined as etiological agents.

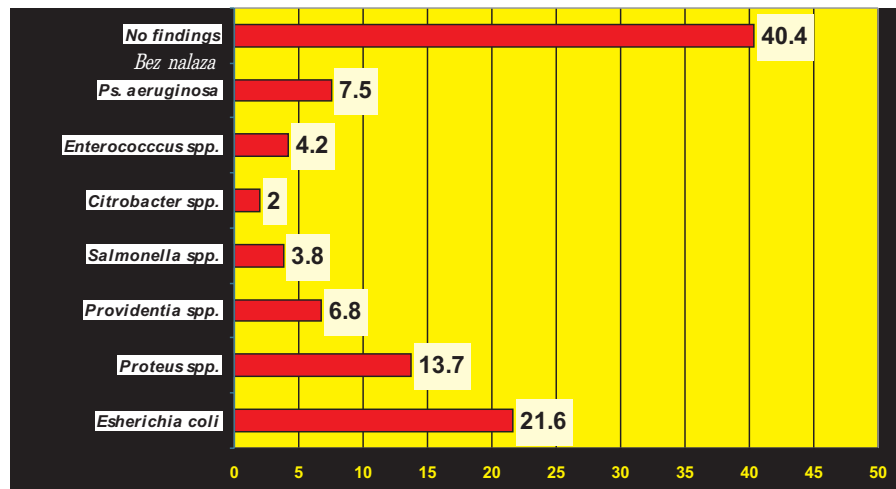


Figure 5. Percentages of bacterial isolates from dead ducklings at the age of 0-7 days / Slika 5. Procenat bakterijskih izolata kod uginulih pačića starih 0-7 dana

Similarly to broiler chickens, *Escherichia coli* was the most prevalent species in newly hatched ducklings – in 21.6% of samples. Then followed species from the *Proteus-Providentia-Morganella* group. The greatest part of isolates were from carcasses of just hatched ducklings and birds up to the age of 3 days, suggesting their vertical transmission.

The more frequent detection of *Ps. aeruginosa* (7.5%) should be emphasized – a twofold higher percentage compared to the findings in newly hatched broiler chickens at the same age. Furthermore, the data were almost comparable for all farms surveyed.

Bacteriological findings in growing ducklings (7-21 days of age) / Bakteriološki nalaz kod pačića u rastu (starosti 7-21 dan)

For this age group, the microbial findings included members of 5 microbial species, presented in Fig. 6.

In growing ducklings, the species diversity of bacterial etiological agents decreased compared to that in newly hatched ones. Again, *Escherichia coli* (18.8%) was dominant, although compared to the first age group, its relative proportion was reduced. The share of salmonella-induced infections, although not high (12.6%), deserved attention because of the high lethality and the risk of a permanent carriership. Special attention should be paid to the isolation of 4 samples of *Riemerella anatipestifer*, the agent of the bacterial polyserositis. The infection was found in 5 batches of different origin in 3 different farms.

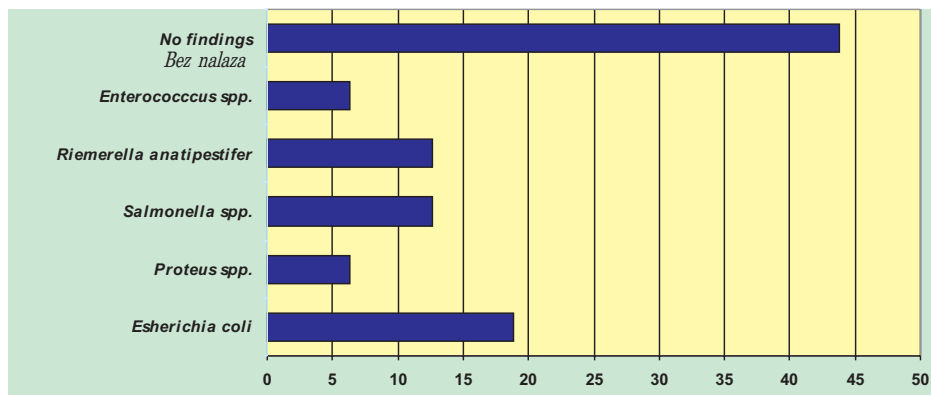


Figure 6. Percentages of bacterial isolates from dead ducklings at the age of 7-21 days /
Slika 6. Procenat bakterijskih izolata kod uginulih pačića starih 7-21 dan

*Bacteriological findings in growing ducklings – 3-6 weeks of age /
Bakteriološki nalaz kod pačića u rastu – starosti 3-6 nedelja*

The analyses proved the existence of 3 microbial species: *Pasteurella multocida* (18.2%), *Salmonella Typhimurium*. (9.1%) and *Riemerella anatipestifer* (9.1%).

The detection of *Pasteurella multocida* causing avian cholera was not unusual in waterfowl rearing whereas the presence of *Riemerella anatipestifer* confirmed the increasing importance of this type of infection. This was also accentuated by the fact that the agent was isolated also from 4 rats from the affected farm. Up to now, similar data were not available in our country.

Reviewing and conclusions / Pregled i zaključci

1. Bacterial infections occupy an important place in the pathology of industrially reared birds – both chicken and waterfowl species. A significant species diversity of etiological agents, most obvious in dead chick embryos and newly hatched chickens and ducklings, was established.

2. With the advancing of age, the number of encountered microbial species in chickens and waterfowl decreased and this was valid for all studied farms and flocks.

3. In chicken fowl at all ages, the *Escherichia coli* sp., causing embryonal death and severe septicaemiae in newly hatched and growing chickens and local infections in older birds, was absolutely dominant.

4. The frequent isolation of *Proteus-Providentia-Morganella* (PPM), whose role in chick embryo pathology is known, implied a revision of the ap-

proach to them throughout their isolation from newly hatched and growing chickens. This was generally applicable also for *Ps. aeruginosa* related infections.

5. In growing chickens, clostridial and mycoplasmatic infections were recognized as problematical.

6. The investigations did not confirm the anticipated more frequent isolation of microbial species as *O. rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Kingella kingii*, *Pasteurella gallinarum*, but this could be due to the relatively low number of tested farms and the rather short period of the survey.

7. In ducks, the repeated detection of pasteurellae as well as of the *Riemerella anatipestifer* species deserved special attention. The isolation of the latter from rats was also an important epidemiological finding with regard to the possibility for the formation of carriership in rodents, combined with accidental or even permanent shedding.

References / Literatura

1. Asplin F. D.: A septicaemic disease of ducklings. Vet. Rec. 67, 854-858, 1955. - 2. Bangun A., Tripathy D. N., Hanson L. E.: Studies of *Pasteurella anatipestifer*: An approach to its classification. Avian Dis. 25, 326-337, 1981. - 3. Brogden K. A., Rhoades K. R., Rimler R. B.: Serologic types and physiologic characteristics of 46 avian *Pasteurella anatipestifer* cultures. Avian Dis. 26, 891-896, 1982. - 4. Charlton B. R.: *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* from California poultry submission. Proc 48th Western Poultry Disease Conference, 80, 1999. - 5. Cooper C. F., Hung P. E., Chang Y. F.: Molecular characterization of a plasmid isolated from *Riemerella anatipestifer*. Avian Pathol. 27, 339-345, 1998. - 6. Frommer A., Bock R., Inbar A., Zemer S: Muscovy ducks as a source of *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey flocks. Avian Pathol 19, 161-163, 1990. - 7. Hafez H. M.: Current status on the role of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. Archiv fuer Gefuergelkunde, 60, 208-211, 1996. - 8. Helfer D. H., Helmboldt C. F.: *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey. Avian Dis. 21, 712-715, 1977. - 9. Loh H., Teo T. P., Tan H.: Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from ducks in Singapore: A proposal of new serotypes. Avian Pathol. 21, 453-459, 1992. - 10. Pathanasophon P., Swada T., Tanticharoenyos T.: New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Pathol. 24, 195-199, 1995. - 11. Piechula K., Pohl S., Mannheim W.: Phenotypic and genetic relationships of so-called *Moraxella* (*Pasteurella*) anatipestifer to the Flavobacterium/Cytophaga group. Vet. Microbiol. 11, 261-270, 1986.

SRPSKI

ETIOLOŠKA STRUKTURA I EPIDEMIOLOŠKI NADZOR BAKTERIJSKIH INFEKCIJA KOD INDUSTRIJSKI GAJENE ŽIVINE U BUGARSKOJ

Valentina Urumova, M. Lyutskanov

Istraživanja su vršena na 9 najvećih živinarskih farmi u Bugarkoj u periodu od 2001. do 2006. godine.

Ispitano je ukupno 833 uzoraka živine – 710 uzoraka živine i 123 uzoraka vodenih ptica. Uzorci su uzeti sa leševa (jetra, slezina, zglobovi, vazdušne kese, tankog creva), kao i sa uginulih embriona, brisevi sa kloake i iz nosa. Analize su vršene koristeći rutinske laboratorijske metode ili polu-automatski sistem identifikacije CRYSTAL za enterobakterije i stafilokoke, kao i API-20 NE sistem za nefermentne bakterije.

Pozitivan nalaz mikroba utvrđen je kod 67,8% uzoraka sa uginulih embriona pilića. Izolati potiču od 13 različitih vrsta mikroba. Izolovano je ukupno 14 vrsta sa uzoraka leševa, iz briseva nosa i kloake. Njihovo specifično prisustvo je u zavisnosti od starosti živine. Ustanovljeni su slični rezultati kod vodenih ptica.

Ključne reči: etiologija, bakterijske bolesti, gajene ptice, rutinske metode, dijagnostika

РУССКИЙ

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПРОМЫШЛЕННО РАЗВЕДЁННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПТИЦ В БОЛГАРИИ

Валентина Урумова, М. Лиутсканов

Исследования совершены на 9 наибольших птицеводческих ферм в Болгарии в периоде от 2001 до 2006.

Нами испытано совокупно 833 образчика сельскохозяйственных птиц - 710 образчиков сельскохозяйственных птиц и 123 образчика водных птиц. Образчики взяты с трупов (печень, селезёнка, сустав, воздушные сумки тонкой кишки), словно и с околетьх эмбрионов, мазки с клоаки и из носа. Анализы совершены, пользуясь рутинные лабораторные методы или полу-автоматическая система идентификации КРИСТАЛ для энтеробактерий и стафилококков, и АПИ-20 НЕ система для неферментных бактерий.

Положительные результаты микробов утверждены у 67,8% образчиков с околетьх эмбрионов цыплят. Изоляты происходят из 13 различных видов микробов. Изолировано нами совокупно 14 видов с образчиков трупов, из мазков носа и клоаки. Их специфическое присутствие в зависимости от старости сельскохозяйственных птиц. Нами установлены подобные результаты у водных птиц.

Ключевые слова: этиология, бактериальные болезни, разведённые птицы, рутинные методы, диагностика

**RATIO OF MEAT PREPARATES TO CARCASS IN CATTLE
SLAUGHTERED IN ISTANBUL******ODNOS PREPARATA MESA U ODNOSU NA TRUPOVE GOVEDA
KLANIH U ISTANBULU*****Ö. Çetin, E. Dümen, H. H. Biçer, Ö. Koçak****

This study was performed to determine the relationship between the ratio of the bones and valuable meat prepares to the carcass, the age and the sex parameters in Holstein and Swiss Braun race cattle which are widely bred in our country.

The half and quarter carcasses of the cattle that are slaughtered in Istanbul were used as working material. The carcasses were separated into 4 groups as above 3 years of age group (n=24), under 3 years of age group (n=46), male group (n=53) and female group (n=17). Totally 140 carcasses were evaluated.

According to the obtained results, hind quarter weight, fillet, loin, rump, tranche, sirloin, round, flank, shank, brisket, fore loin, sticking, chuck and total bones parameters were significantly different at ($p<0.001$) level between above the 3 years of age and under the 3 years of age group. Between the same groups the sirloin tip parameter was significantly different at $p<0.01$ level. At the parameters of leg weight, shank and half carcasses there was no significant difference between the groups.

We could not determine any significant differences in the percentage ratio of all meat parameters to the carcass between the groups of above 3 years of age and under 3 years of age.

In the male and female groups, all the parameters except loin, leg weight and shank were significantly different between the 2 groups. Hind quarter and shank parameters were significantly different at $p<0.05$ level, round parameter was significantly different at $p<0.01$ level, and the other valuable meat prepares were significantly different at $p<0.001$ level.

* Rad primljen za štampu 7. 9. 2007. godine

** Ömer Çetin, Emek Dümen, Istanbul University School of Veterinary Medicine Dept. of Food Hygiene & Technology, Avcılar, Istanbul; H. Hakan Biçer, Real Hipermarketler Zinciri A. S.; Ömür Koçak, Istanbul University School of Veterinary Medicine Dept. of Animal Breeding & Husbandry, Avcılar, Istanbul

Rump parameter was evaluated as significantly different at $p < 0.05$ level between male and female groups. The other parameters were not significantly different between the mentioned groups.

Key words: ratio, bones, meat, carcass, age, sex, Holstein race cattle, Swiss Braun race cattle

Introduction / Uvod

Meat is one of the most essential foodstuff for human nutrition because of its composition and organic contents. The essential aminoacids that are included in meat proteins are needed to form numerous body functions of human beings, and especially of children [12, 14, 18, 24].

The production of red meat and its products are generally provided by large farms in our country. The meat and the Fish Cooperation, slaughterhouses that belong to municipalities and integrated meat companies are the main providers of meat and its products [9, 16]. Unfortunately, grading processes cannot be applied perfectly except in The meat and the Fish Cooperation and some private slaughterhouses in our country [5, 16, 17]. The meat quality of the large farm animals differs according to the different individual properties such as race, age, sex, fat ratio and etc. Furthermore, during the time interval from slaughtering to consuming the meat and / or its products some quality criterions may be changed [13, 26].

The average weight of the carcasses of the local and half-bred race large farm animals that are slaughtered is 140 kg. and 200 kg. respectively [9, 19]. In the developed countries these values differ from 477 kg. to 500 kg. [10, 11]. Because of the low weight ratio of the carcasses of the local races, breeders generally prefer half – bred races.

The prices of the meat preparates differ depending on their qualities. Fore loin, fillet, rump and tranche are known as valuable meat preparates and the prices of these products are naturally higher than the lower quality meat preparates such as flank and other friers [6, 20]. Besides, the valuable meat preparates can be processed technologically and sold in the form of meat products such as pastirami and smoked meat, which are highly preferred by the Turkish consumers [23].

Generally, the meat preparates that are obtained from the carcasses, are utilized according to the processing abilities of the meat and the meat's value. However, some integrated private meat companies can offer the valuable meat preparates as "fresh meat" to the market after applying suitable technological processes to the products and the "fresh meat" market is becoming a new sector with the help of technological processes [1, 7, 22, 26].

In this study, the objective was to determine the ratio of the valuable meat preparates and the bones that are obtained from carcasses of half-bred race large farm animals to the carcasses according to the animals' age and sex.

Material / Materijal

The carcasses of two half - bred races (Holstein and Swiss Braun) were used as working material. The carcasses were obtained from different slaughterhouses located in Istanbul city.

The carcasses were separated into 4 groups as the above 3 years old (n=24), under 3 years old (n=46), male (n=53) and female (n=17). Totally 140 carcasses were evaluated.

Method / Metode

Assignment of the races / Određivanje rasa

Slaughterhouse documents were evaluated as base documents in the process of the assignment of the races.

Assignment of the ages / Određivanje uzrasta

In the process of the age assignment slaughterhouse documents were evaluated as base documents. Besides, the projecting parts of thoracal, lumbal and sacral vertebrae were examined if they were in the form of cartilage or bone for verification of the slaughterhouse documents [8, 25].

Assignment of sex / Određivanje pola

In the process of the sex assignment, slaughterhouse documents were evaluated as base documents. Besides, development of the neck muscles and chest parts of the carcasses were examined for verification. In addition, *Musculus gracilis*, *Canalis inguinalis* testicular fat tissues, the angle of *Symphysis pelvis* and *Tuberculum pubicum* were examined, too [25].

Prime Cutting / Krupno sečenje

The carcasses were cut along the median line and half carcasses were obtained. Half carcasses were cut again, from the level of 12th and 13th costa and the front and the back quarter carcasses were obtained. Quarter carcasses were kept in suitable warehouse conditions at +4 °C for 3 days for aging processes. After aging was completed, all the quarter carcasses were weighed one by one [3, 4, 13].

Detail Cutting / Detaljno sečenje

From the back quarter of the carcasses, rump, round, tranche, sirloin, sirloin tip and shank, from the lumbal part of the carcasses fillet, loin and from the

front part of the carcasses preparates were obtained. Then all the preparates were weighed by using sensitive balance and percentage calculations of the preparates to the carcass that the evaluates preparete belonged to, were performed for each preparete one by one [24, 25].

Statistical Analysis / Statistička analiza

The samples obtained from the groups were evaluated statistically. Statistical analysis was performed at SPSS version 10.0 [21].

Results / Rezultati

The meat preparates and the bones that were obtained from quarter carcasses were rated to the half and whole carcass weight that the meat preparates and the bones belonged. The results are shown in Table 1, Table 2, Table 3 and Table 4.

Table 1. *The amount of meat preparates and bones in carcasses of the under 3 years of age and above 3 years of age groups of the front and back quarters (kg.)*
 Tabela 1. *Količina preparata mesa i kostiju trupova životinja starih manje od 3 godine i više od 3 godine sa prednjih i zadnjih četvrti (kg)*

Back quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa zadnje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Hind Quarter / <i>Zadnja četvrt ***</i>	1	46	84,15	± 0,86
	2	24	92,69	± 0,89
Fillet / <i>File ***</i>	1	46	2,45	± 0,03
	2	24	2,71	± 0,04
Loin / <i>Slabina ***</i>	1	46	4,57	± 0,05
	2	24	5,02	± 0,06
Rump / <i>Krsta ***</i>	1	46	8,70	± 0,12
	2	24	9,81	± 0,15
Tranche / <i>Šnicla ***</i>	1	46	9,63	± 0,10
	2	24	10,59	± 0,13
Sirloin / <i>Bubrežnjak ***</i>	1	46	4,14	± 0,05
	2	24	4,50	± 0,05
Round / <i>But ***</i>	1	46	6,57	± 0,11
	2	24	7,30	± 0,08
Sirloin Tip / <i>Vrh bubrežnjaka **</i>	1	46	7,57	± 0,10
	2	24	8,10	± 0,15
Flank / <i>Potrbušina ***</i>	1	46	9,20	± 0,09
	2	24	10,10	± 0,11
Shank / <i>Kolenica ***</i>	1	46	5,50	± 0,08
	2	24	5,93	± 0,08

nastavak table 1.

Fore quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa prednje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Leg / <i>Noga</i>	1	46	112,01	± 21,94
	2	24	98,63	± 1,02
Brisket / <i>Grudi ***</i>	1	46	16,41	± 0,16
	2	24	17,87	± 0,20
Fore Loin / <i>Leđja ***</i>	1	46	6,28	± 0,08
	2	24	6,94	± 0,08
Sticking / <i>Donji deo vrata ***</i>	1	46	14,67	± 0,13
	2	24	15,79	± 0,29
Chuck / <i>Greben ***</i>	1	46	17,47	± 0,15
	2	24	19,21	± 0,19
Shank / <i>Kolenica</i>	1	46	4,40	± 0,12
	2	24	4,66	± 0,06
Amount of total bone and half carcasses / <i>Ukupna količina kostiju i polutke</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Total Bones / <i>Ukupno kostiju ***</i>	1	46	31,61	± 0,16
	2	24	34,52	± 0,18
Half carcass / <i>Polutka</i>	1	46	196,17	± 22,15
	2	24	191,32	± 1,85

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05

Group 1: Below 3 years of age / *Grupa 1: Ispod 3 godine starosti*

Group 2: Above 3 years of age / *Grupa 2: Iznad 3 godine starosti*

Table 2. The percentage ratio of meat preparates and bones in carcasses of the under 3 years of age and above 3 years of age groups of the front and back quarters

Tabela 2. Procentualni odnos preparata mesa i kostiju prednjih i zadnjih četvrti trupova životinja starih ispod 3 godine i preko 3 godine

Back quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa zadnje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Hind Quarter / <i>Zadnja četvrt %</i>	1	46	47,373	± 0,89
	2	24	48,45	± 0,13
Fillet / <i>File %</i>	1	46	1,37	± 0,26
	2	24	1,41	± 0,10
Loin / <i>Slabina %</i>	1	46	2,57	± 0,04
	2	24	2,62	± 0,01
Rump / <i>Krsta %</i>	1	46	4,89	± 0,10
	2	24	5,13	± 0,05
Tranche / <i>Šnicla %</i>	1	46	5,42	± 0,10
	2	24	5,53	± 0,04

nastavak table 2.				
Sirloin / <i>Bubrežnjak</i> %	1 2	46 24	2,35 2,35	± 0,04 ± 0,01
Round / <i>But</i> %	1 2	46 24	3,69 3,81	± 0,08 ± 0,02
Sirloin Tip / <i>Vrh bubrežnjaka</i> %	1 2	46 24	4,26 4,23	± 0,09 ± 0,06
Flank / <i>Potrbušina</i> %	1 2	46 24	5,18 5,27	± 0,09 ± 0,02
Shank / <i>Kolenica</i> %	1 2	46 24	3,09 3,09	± 0,06 ± 0,01
Fore quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa prednje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Leg / <i>Noga</i> %	1 2	46 24	52,63 51,55	± 0,89 ± 0,13
Brisket / <i>Grudi</i> %	1 2	46 24	9,23 9,34	± 0,17 ± 0,03
Fore Loin / <i>Ledja</i> %	1 2	46 24	3,53 3,62	± 0,07 ± 0,01
Sticking / <i>Donji deo vrata</i> %	1 2	46 24	8,26 8,24	± 0,15 ± 0,11
Chuck / <i>Greben</i> %	1 2	46 24	9,84 10,04	± 0,18 ± 0,03
Shank / <i>Kolenica</i> %	1 2	46 24	2,25 2,24	± 0,07 ± 0,01
Amount of total bone and half carcasses / <i>Ukupna količina kostiju i polutke</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Total Bones / <i>Ukupno kostiju</i> %	1 2	46 24	17,79 18,04	± 0,17 ± 0,03

Group 1: Below 3 years of age / *Grupa 1: Ispod 3 godine starosti*

Group 2: Above 3 years of age / *Grupa 2: Iznad 3 godine starosti*

Table 3. The amount of meat preparates and bones in carcasses of male and female groups of the front and back quarters (kg.)

Tabela 3. Količina preparata mesa i kostiju sa prednjih i zadnjih četvrti trupova mužjaka i ženki (kg)

Back quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa zadnje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Hind Quarter / <i>Zadnja četvrt ***</i>	1	53	84,46	± 0,90
	2	17	92,48	± 1,01
Fillet / <i>File ***</i>	1	53	2,45	± 0,03
	2	17	2,71	± 0,04
Loin / <i>Slabina ***</i>	1	53	4,63	± 0,05
	2	17	5,03	± 0,05
Rump / <i>Krsta ***</i>	1	53	8,84	± 0,12
	2	17	9,86	± 0,18
Tranche / <i>Šnicla ***</i>	1	53	9,78	± 0,11
	2	17	10,57	± 0,16
Sirloin / <i>Bubrežnjak ***</i>	1	53	4,19	± 0,05
	2	17	4,51	± 0,06
Round / <i>But **</i>	1	53	6,69	± 0,10
	2	17	7,29	± 0,08
Sirloin Tip / <i>Vrh bubrežnjaka</i>	1	53	7,68	± 0,09
	2	17	8,02	± 0,20
Flank / <i>Potrbušina ***</i>	1	53	9,32	± 0,10
	2	17	10,14	± 0,12
Shank / <i>Kolenica *</i>	1	53	5,56	± 0,08
	2	17	5,93	± 0,08
Fore quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa prednje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Leg / <i>Noga</i>	1	53	91,82	± 0,88
	2	17	98,33	± 1,06
Brisket / <i>Grudi ***</i>	1	53	16,65	± 0,17
	2	17	17,82	± 0,22
Fore Loin / <i>Ledja ***</i>	1	53	6,37	± 0,07
	2	17	6,96	± 0,10
Sticking / <i>Donji deo vrata *</i>	1	53	14,90	± 0,14
	2	17	15,66	± 0,36
Chuck / <i>Greben ***</i>	1	53	17,74	± 0,17
	2	17	19,20	± 0,21
Shank / <i>Kolenica</i>	1	53	4,43	± 0,11
	2	17	4,65	± 0,06
Amount of total bone and half carcasses / <i>Ukupna količina kostiju i polutke</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Total Bones / <i>Ukupno kostiju ***</i>	1	53	32,06	± 0,17
	2	17	34,45	± 0,17
Half carcass / <i>Polutka ***</i>	1	53	171,29	± 1,75
	2	17	190,81	± 1,98

Group 1: Male / *Grupa 1: Mužjaci* ; Group 2: Female / *Grupa 2: Ženke*

Table 4. *The percentage ratio of meat preparates and bones in carcasses of the male and female groups of the front and back quarters*

Tabela 4. *Procentualni odnos preparata mesa i kostiju sa prednjih i zadnjih četvrti trupova mužjaka i ženki*

Back quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa zadnje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Hind Quarter / <i>Zadnja četvrt %</i>	1	53	48,19	± 0,10
	2	17	48,47	± 0,15
Fillet / <i>File %</i>	1	53	1,40	± 0,01
	2	17	1,42	± 0,01
Loin / <i>Slabina %</i>	1	53	2,61	± 0,01
	2	17	2,64	± 0,01
Rump / <i>Krsta %</i>	1	53	5,00	± 0,04
	2	17	5,16	± 0,06
Tranche / <i>Šnicla %</i>	1	53	5,51	± 0,02
	2	17	5,53	± 0,05
Sirloin / <i>Bubrežnjak %</i>	1	53	2,36	± 0,01
	2	17	2,36	± 0,01
Round / <i>But %</i>	1	53	3,77	± 0,04
	2	17	3,81	± 0,02
Sirloin Tip / <i>Vrh bubrežnjaka %</i>	1	53	4,33	± 0,03
	2	17	4,20	± 0,08
Flank / <i>Potrbušina %</i>	1	53	5,25	± 0,01
	2	17	5,31	± 0,02
Shank / <i>Kolenica %</i>	1	53	3,13	± 0,02
	2	17	3,10	± 0,02
Fore quarter carcass meat preparates / <i>Preparati mesa sa prednje četvrti</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Leg / <i>Noga %</i>	1	53	51,87	± 0,10
	2	17	51,33	± 0,15
Brisket / <i>Grudi %</i>	1	53	9,39	± 0,02
	2	17	9,34	± 0,04
Fore Loin / <i>Ledja %</i>	1	53	3,59	± 0,02
	2	17	3,64	± 0,02
Sticking / <i>Donji deo vrata %</i>	1	53	8,40	± 0,02
	2	17	8,20	± 0,16
Chuck / <i>Greben %</i>	1	53	10,01	± 0,03
	2	17	10,06	± 0,03
Shank / <i>Kolenica %</i>	1	53	2,50	± 0,05
	2	17	2,43	± 0,01
Amount of total bone and half carcasses / <i>Ukupna količina kostiju i polutke</i>	Group / <i>Grupa</i>	Number (n) / <i>Broj</i>	Mean (% value) / <i>Srednja vrednost</i>	St. Mean Error / <i>Standardna devijacija</i>
Total Bones / <i>Ukupno kostiju %</i>	1	53	18,08	± 0,03
	2	17	18,05	± 0,03

Group 1: Male / *Grupa 1: Mužjaci* ; Group 2: Female / *Grupa 2: Ženke*

Discussion and Conclusion / *Diskusija i zaključak*

According to the obtained results, significant differences were determined between carcasses of the above 3 years of age and under 3 years of age and male and female groups. Cold carcass weights, valuable meat preparates and bone ratios parameters were analysed.

According to our study, the average of the carcass weights of the below 3 years of age, above 3 years of age, male and female groups were determined as 392.34 kg, 382.64 kg, 354.58 kg ve 381.62 kg respectively. In a study performed by Fiems *et al.* [11], it was indicated that the cold carcass weight values of double-musled Belgian Blue race cattle as from 469.7 kg. to 500.8 kg. According to another study of Fiems *et al.* [10], the average weight values of non - pregnant and non - lactating female cattle was about 447.0 kg.

Between the groups of above 3 years of age and under 3 years of age, we determined significant differences for all the parameters except shank. Significant difference at ($p < 0.001$) level were found in the hind quarter weight, fillet, loin, rump, tranche, sirloin, round, flank, brisket, fore loin, sticking, leg, chuck and weight of the among leg muscles parameters. Sirloin tip parameter was also significantly different at ($p < 0.01$) level. In the parameters of leg weight and shank, the results were higher in the above 3 years of age group than the under 3 years of age group, however the differences were not significant between the two groups.

The percentage ratio of all valuable meat preparates to its carcass was not significantly different between the groups of above 3 years of age and under 3 years of age. However, in general, the percentage ratio of the valuable meat preparates to its carcass was higher in the group of above 3 years of age than the percentage ratio of the valuable meat preparates to its carcass in the group of under 3 years of age.

Between the male and female groups, significant differences were determined for all parameters except sirloin tip, leg weight and shank. Hind quarter, shank and sticking parameters were significantly different between the groups at ($p < 0.05$) level, round significantly different between the groups at ($p < 0.01$) level and the other valuable meat preparates were significantly different between the groups at ($p < 0.001$) level.

According to the results of the parameters in question, rump was significantly different at ($p < 0.05$) level between the male and the female groups. The other parameters were not evaluated as significantly different between the groups.

At the mean values of percentage bone ratio to the carcass parameters, our findings were 18.04% in the group of above 3 years of age, 17.79 % in the group of under 3 years of age, 18.08% in the group of male and 18.05% in the group of female. Altuntas [2] points out that the mean values of percentage bone ratio to the carcass parameters are between 14.90% and 15.46% at Simental race cattle. According to Yücesan [26], the percentage ratio of bones to the carcasses

at local and half-bred races are 19.5% and 18.8% respectively. Özbeyaz *et al.* [19] indicate the percentage ratio of bones to the carcasses at Brangus hybrid male calves, Simental melezi erkek danalarda ve limozin melezlerinde are 16.0%, 16.2% and 15.9 % respectively. According to Koçak *et al.* [15], the bone ratio values of 11 -15 month old Holstein male cattle to the carcass are between 16.4% - 18.48%.

In this study the results show that the ratios of the bones and the valuable meat preparates to the carcass were higher in the above 3 years of age group than in the under 3 years of age group, but the same ratio values in the male and female groups differed similarly from each other.

References / *Literatura*

1. Albay R., Tayar M., Sen C.: Ülkemizde üretilen sigir karkaslarının kalite ve verim derecesinin saptanması üzerine araştırmalar, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Et ve Ürünleri Sempozyumu '96. 17-18 Ekim, İstanbul, 1996. - 2. Altuntas M., Arpacik R.: Farklı yaşlarda besiye alınan simental tosunlarda besi performansı ve optimum kesim ağırlıkları. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.*, 44, 1, 7-16, 2004. - 3. Anonymus: T.S.E. Kasaplık büyükbaş ve küçükbaş hayvan gövde etleri T.S.E. 666-673 Ankara, 1989. - 4. Anonymus: T.S.E. Standartları, Sigir Gövde Etleri (karkas), Türk Standartları T.S.E 383 Ankara, 1990. - 5. Bingöl S: Kırmızı Et Mamülleri Sanayiinde Girdi Sorunları ve Verimlilik, Milli Produktive Merkezi Yayınları Yayın NO:554 Ankara, 1996. - 6. Bischoff G., Bamberger G., Bibbes K.: *Fleischverarbeitung*, Schulverlang Hannover, 1982. - 7. Cicioğlu R.: Türkiye'nin Et kaynakları ve Dünya Et Kaynakları ile Mukayesesi Seminer Notları, İstanbul, 1996. - 8. Çalışlar T.: *Evcil Hayvanlar Anatomisi*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Bilim Dalı, 1985. - 9. Evrim M., Günes H.: Özel Zootekni İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın no: 49, 1992. - 10. Fiems L. O., De Campeneere S., Van Caelenbergh W., De Boever J. L., Vanacker J. M.: Carcass and meat quality in double-muscled Belgian Blue bulls and cows. *Meat Science* 63, 345-352, 2003. - 11. Fiems L. O., Van Caelenbergh W., Vanacker J. M., De Campeneere S., Seynaeve M.: Prediction of empty body composition of double-muscled beef cows. *Livestock Production Science*, 92, 249-259, 2005. - 12. Gökalp H. Y.: Genel Et Bilimi ve Teknolojisi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Erzurum, 1984. - 13. Inal T., Nazlı B.: *Mezbaha Bilgisi*, Saray Medikal Yay. İzmir, 1996. - 14. Kim C. J., Lee E. S.: Effects of quality on the chemical, physical and sensory characteristics of Hanwoo Korean native cattle) beef. 63, 397-405, 2003. - 15. Koçak D., Cosar S., Tulgar N.: Farklı düzeylerde enerji içeren konsantre yemlerle kis mevsiminde açıkta beslenen holstayn erkek danaların besi performansı ve karkas özellikleri. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.*, cilt 35, sayı 1-2, 1995. - 16. Nazlı B.: Grading, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Seminer Notları, 1990. - 17. Oral M.: Grading Üzerine Çalışmalar Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi No.:32, 1996. - 18. Özatan A.: Et Bilimi ve Teknolojisi, Haccettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü No:19 Ankara, 1993. - 19. Özbeyaz C., Bağcı C., Yagcı T., Alpan O.: Brangus, Limozin ve Simental bogalarla Jersey ineklerden et üretimi için kullanma melezleri elde edilmesi (II. Besi, kesim ve karkas özellikleri). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, cilt 37, sayı 2., 1997. - 20. Sarıcan C.: Sigir karkaslarında karkas kalitesini etkileyen ana faktörler. *Animal Enformasyon*, 15, 149, 1998. - 21. SPSS 9.01 for windows. SPSS Inc, Chiago, IL, 1998. - 22. Tayar, M., Sen C., Albay R., Yıldız B.: Sigir karkaslarının derecelendirilmesi ve et veriminin saptanması üzerine araştırmalar, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12/1, 97-102, 1993. - 23. Tekinsen C., Doğruer Y.: Her Yönüyle Pastırma. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2000. - 24. Ugur M.,

Nazli B., Bostan K., Aksu H.: Et ve Et Ürünleri Teknolojisi. Ders Notu No: 111, İstanbul, 1999. - 25. Yildirim Y.: Et Endüstrisi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kozan ofset, Ankara, 1996. - 26. Yücesan A., Ergün Ö.: Çesitli sigir ırklarımıza ait karkaslarda kemik ve büyük parça kısımlarının oranları üzerine bir çalışma. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 26, 2, 483-487, 2000.

SRPSKI

ODNOS PREPARATA MESA U ODNOSU NA TRUPOVE GOVEDA KLANIH U ISTANBULU

O. Cetin, E. Dumen, H. H. Bicer, O. Kocak

Istraživanja su izvršena da bi se ustanovio odnos između kostiju i vrednih delova mesa s obzirom na trup, uzrast i pol kod holštajn i švajcarskih smeđih rasa goveda čije je uzgajanje široko rasprostranjeno u našoj zemlji.

Polovine i četvrtine trupova goveda koje se kolju u Istanbulu su korišćene kao radni materijal. Trupovi su podeljeni na 4 grupe, i to: starosna grupa iznad 3 godine ($n=24$), ispod 3 godine ($n=46$), grupa mužjaka ($n=53$), i grupa ženki ($n=17$). Ispitano je ukupno 140 trupova.

Na osnovu dobijenih rezultata, parametri za težinu zadnje četvrti, file, slabinu, krsta, šniclu, bubrežnjak, but, potrbušinu, kolenicu, grudi, pečenicu, donji deo vrata, greben, i ukupne kosti značajno ($p<0,001$) su se razlikovali između starosnih grupa, odnosno životinja iznad i ispod 3 godine starosti. Između istih grupa, parametri za vrh slabine bili su značajno različiti ($p<0,01$). Kod parametara za težinu noge, kolenice i polutke nije bilo značajnih razlika između grupa.

Nisu ustanovljene značajne razlike između procentualnog odnosa svih parametara mesa u odnosu na trupove između grupa iznad i ispod 3 godine starosti.

Između grupa mužjaka i ženki utvrđene su značajne razlike kod svih parametara osim za slabinu, težinu noge i kolenice. Značajne razlike ($p<0,05$) su registrovane između parametara za zadnju četvrt i kolenicu, takođe značajna razlika ($p<0,01$) kod parametara za but, a i ostali preparati mesa su se takođe značajno razlikovali ($p<0,001$).

Ustanovljena je značajna razlika ($p<0,05$) kod parametara za krsta između grupa mužjaka i ženki. Ostali parametri se nisu značajno razlikovali između pomenutih grupa.

Ključne reči: odnos, kosti, meso, trup, starost, pol, Holštajn rasa goveda, švajcarska smeđa rasa goveda

ОТНОШЕНИЕ ПРЕПАРАТА МЯСА В ОТНОШЕНИИ ТУЛОВИЩЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА УБИТЫХ В СТАМБУЛЕ

О. Цетин, Е. Дитен, Х. Х. Бикер, О. Коцак

Исследования совершены, чтобы установилось отношение среди костей и стоящих частей мяса в отношении туловища, возраста и пола у холштайн и швейцарских бурых пород крупного рогатого скота чьё разведение широко распространено в нашей стране.

Половинки и четвертинки туловищей крупного рогатого скота, убиваемые в Стамбуле, использованные в качестве рабочего материала. Туловища разделены на 4 группы, а именно: возрастная группа сверх 3 года ($n=24$), ниже 3 года ($n=46$), группа самцов ($n=53$), и группа самок ($n=17$). Нами испытано совокупно 140 туловищей.

На основе полученных результатов, параметры для веса задней четверти, филе, бок, крестец, щницель, почелная часть, окорок, брюшину, коленину, грудь, хребтину, нижняя часть шеи, гребень, и совокупные кости значительно ($p<0,001$) различались среди возрастных групп, относительно животных сверх и ниже 3 года возраста. Среди таких же групп, параметры для верха бока были значительно различные ($p<0,01$). У параметров для веса ноги, коленины и половинки не было значительных разниц среди групп.

Не устновлены значительные разницы среди процентного отношения всех параметров мяса в отношении туловищей среди групп сверх и ниже 3 года возраста.

Утверждены значительные разницы среди групп самцов и самок у всех параметров кроме для бока, веса ноги и коленины. Существовала значительная разница ($p<0,05$) среди параметров для задней четверти и коленины, также значительная разница ($p<0,01$) у параметров для ляжки, а и остальные параметры мяса также значительно различались ($p<0,001$).

Установлена значительная разница ($p<0,05$) у параметров для крестец среди групп самцов и самок. Остальные параметры не значительно различались среди упомянутых групп.

Ключевые слова: отношение, кости, мясо, туловище, возраст, пол, Холштайн порода крупного рогатого скота, Swis Braun порода крупного рогатого скота

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE U BEOGRADU 2007. GODINE

Mihajlović B. Lazar

Rođen 1. 11. 1980. u Ćupriji
Diplomirao 27. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Ćuprija
Cara Lazara 2/2

Đurić M. Božana

Rođena 14. 12. 1966. u Prijedoru
Diplomirala 31. 5. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Šafarikova 6/B

Stanisavljević D. Milan

Rođen 11. 9. 1978. u S. Mitrovici
Diplomirao 4. 7. 2007. godine
Stalno mesto boravka Mač. Mitrovica
Draguljuba Veljanovića 8

Dinčić S. Emina

Rođena 26. 4. 1972. u Uzdinu
Diplomirala 4. 7. 2007. godine
Stalno mesto boravka Uzdin
Mihajla Emineskva 160

Pantović R. Miroslav

Rođen 24. 9. 1974. u Kuli
Diplomirao 4. 7. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Vojvode Stepe 141

Tomasović B. Dalibor

Rođen 13. 2. 1979. u Šibeniku
Diplomirao 25. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Banja Luka
Republika Srpska
Save Tekelije 22

Radisavljević M. Katarina

Rođena 14. 9. 1980. u Beogradu
Diplomirala 28. 06. 2007. godine
Stalno mesto boravka Mladenovac
31. nova 7

Keserović A. Slobodan

Rođen 15. 7. 1979. u Beogradu
Diplomirao 28. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Obrenovac
Belopoljska 35/5

Perić S. Boris

Rođen 18. 5. 1977. u Bijeljini, BiH
Diplomirao 27. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Zemun
Pregrevica 166

Ilić M. Goran

Rođen 31. 12. 1977. u Kragujevcu
Diplomirao 27. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Kragujevac
Neznanog junaka 18/31

Đurić M. Miloje

Rođen 2. 2. 1980. u Bihaću
Diplomirao 26. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Šavnička 45

Perić C. Žikica

Rođen 22. 1. 1980. u Požarevcu
Diplomirao 26. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Požarevac
Vojske Jugoslavije 43

Mirjanić G. Bojan

Rođen 17. 5. 1981. u Gradišnici, BiH
Diplomirao 19. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Gradiška
Republika Srpska
Gradske brigade bb

Gligorić D. Snježana

Rođena 16. 1. 1981. u Tomislavgradu
Diplomirala 20. 6. 2007. godine

Berić S. Radovan

Rođen 10. 12. 1975. u Somboru
Diplomirao 25. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Sivic
Kurirska 2

Panić, Lj. Maja

Rođena 22. 8. 1979. u Beogradu
Diplomirala 19. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Goce Delčeva 22/28

Popadić M. Zaga

Rođena 5. 1. 1964. u Prijepolju
Diplomirala 19. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Kaluđerica
Alekse Nenadovića 2/c

Filipović S. Goran

Rođen 12. 9. 1978. u Podgorici
Diplomirao 19. 6. 2007. godine
Stalno mesto boravka Podgorica
Kozaračka 43

Radovanov D. Milivoj

Rođen 6. 12. 1980 u Novom Sadu
Diplomirao 28. 5. 2007. godine
Stalno mesto boravka Novi Kneževac
Koče Kolara 63

Hornjak V. Ivana

Rođena 21. 4. 1976. u Vinkovcima
Diplomirala 16. 5. 2007. godine
Stalno mesto boravka Vukovar
Republika Hrvatska
Mirogojska 16

Vukadinović D. Darko

Rođen 24. 1. 1978. u Arandelovcu
Diplomirao 26. 4. 2007. godine
Stalno mesto boravka Topola
34312 Belosavci

Nikolić V. Danijela

Rođena 22. 10. 1978. u Čupriji
Diplomirala 27. 11. 2006. godine
Stalno mesto boravka Paraćin
Carice Milice 13

Bošković R. Jovica

Rođen 15. 1. 1966. u Kraljevu
Diplomirao 10. 10. 2007. godine
Stalno mesto boravka Kraljevo
Ivana Milutinovića 26

Radosavljević D. Slavoljub

Rođen 12. 7. 1979. u Čačku
Diplomirao 25. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Gornja Atenica
48 bb

Kalo I. Žolt

Rođen 29. 5. 1974. u Subotici
Diplomirao 26. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Jurija Gagrina 71/18

Trbojević B. Jovan

Rođen 25. 4. 1979. u Zrenjaninu
Diplomirao 20. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka B. Višnjićevo
Žarka Zrenjanina 12

Olovenikov S. Nikola

Rođen 9. 7. 1972. u Nišu
Diplomirao 24. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Vidikovački venac 6/8

Radovanović M. Aleksandar

Rođen 24. 8. 1981. u Svilajncu
Diplomirao 20. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Svilajnac
Crkvenac

Borković J. Mirko

Rođen 28. 9. 1980. u Gradišci
Diplomirao 25. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Gradiška
Čatrnja bb

Obradović R. Milan

Rođen 23. 10. 1981. u Beogradu
Diplomirao 24. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Miročka 6

Đorđić D. Mladen

Rođen 25. 5. 1978. u Bijeljini
Diplomirao 20. 9. 2007. godine
Stalno mesto boravka Bijeljina
Batković bb

Šekarić N. Marko

Rođen 23. 11. 1978. u Nikšiću
Diplomirao 27. 4. 2007. godine
Stalno mesto boravka Podgorica
Primorska 123