

ISSN 1580-4003

THE SCIENTIFIC JOURNAL OF THE VETERINARY FACULTY UNIVERSITY OF LJUBLJANA

# SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH

SLOVENSKI VETERINARSKI ZBORNIK

Supplement 17

# 60 let

študija  
veterinarske  
medicine  
v Sloveniji

Volume **53** Suppl **17**

Slov Vet Res • Ljubljana • 2016 • Vol 53 • Supplement 17 • 1-246

ISSN 1580-4003

THE SCIENTIFIC JOURNAL OF THE VETERINARY FACULTY UNIVERSITY OF LJUBLJANA

# SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH

SLOVENSKI VETERINARSKI ZBORNIK

Supplement 17

6. Slovenski veterinarski kongres  
6<sup>th</sup> Slovenian Veterinary Congress  
2016

Portorož, 2. - 3. December 2016

Volume **53** Suppl **17**

Slov Vet Res • Ljubljana • 2016 • Vol 53 • Supplement 17 • 1-246

The Scientific Journal of the Veterinary Faculty University of Ljubljana

**SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH**  
**SLOVENSKI VETERINARSKI ZBORNIK**  
**Supplement 17**

6<sup>th</sup> Slovenian Veterinary Congress

6. Slovenski veterinarski kongres

Portorož, Slovenia

2-3 December 2016

Editor in Chief / glavni in odgovorni urednik: Gregor Majdič

Co-Editor / sourednik: Modest Vengušt

Technical Editor / tehnični urednik: Matjaž Uršič

Assistants to Editor / pomočnici urednika: Valentina Kubale Dvojmoč, Klementina Fon Tacer

.....

Programski odbor / Program Committee

Predsednik / President: Gregor Majdič, Veterinarska fakulteta Univerza v Ljubljani

Člani / Members: Breda Jakovac Strajn, Urška Jamnikar Ciglencečki, Petra Kramarič, Ana Nemeč, Joško Račnik, Tomaž Snoj, Mateja Stvarnik, Ivan Toplak, Milka Vrecl Fazarinc, Olga Zorman Rojs, Veterinarska fakulteta Univerza v Ljubljani, Milorad Radakovic, University of Cambridge, Department of Veterinary Medicine, Matej Luštek, Krka d. d., Ožbalt Podpečan, Veterinarska zbornica, Andreja Bizjak, UVHVVR

Organizacijski odbor / Organising Committee

Predsednik / President: Andrej Kirbiš, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Člani / Members: Damjana Grobelšek, Urška Jamnikar Ciglencečki, Luka Milčinski, Bojan Zorko, Veterinarska fakulteta Univerza v Ljubljani, Ožbalt Podpečan, Veterinarska zbornica, Janez Posedi, UVHVVR

.....

Prispevki so recenzirani

Address: Veterinary Faculty, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

Naslov: Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenija

Tel.: +386 (0)1 47 79 100, 47 79 129, Fax: +386 (0)1 28 32 243

E-mail: slovetres@vf.uni-lj.si

Sponsored by the Slovenian Research Agency

Sofinancira: Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije

ISSN 1580-4003

Printed by / tisk: DZS, d.d., Ljubljana

Indexed in / indeksirano v: Agris, Biomedicina Slovenica, CAB Abstracts, IVSI

Ulrich's International Periodicals Directory, Science Citation Index Expanded,

Journal Citation Reports/Science Edition

<http://www.slovetres.si/>

## **Spoštovane kolegice in kolegi,**

Pred dvema leti, na 5. Slovenskem veterinarskem kongresu, smo vas povabili, da si zabeležite leto 2017 kot leto naslednjega Slovenskega veterinarskega kongresa. Veseli smo, da se bomo srečali že eno leto prej, leta 2016, ob posebnem in veselem dogodku, saj letos praznujemo že 60 let od vpisa prvih študentov na Veterinarsko fakulteto v Ljubljani. Šestdeset let je in ni veliko. Za najstarejše svetovne univerze, stare nekaj stoletij, 60 let ni veliko. A 60 let je opazno obdobje, in prepričani smo, da smo vsi skupaj lahko ponosni na vse, kar smo dosegli v teh 60 letih. Od skromnih začetkov tako rekoč iz nič, smo danes postali sodobna fakulteta, prepoznana in priznana v Evropskem prostoru. Dvakrat smo opravili evalvacijo evropskega združenja veterinarskih fakultet, kar omogoča našim diplomantom, da se brez ovir zaposlujejo kjerkoli v državah evropske unije. Ves čas si prizadevamo za izboljševanje pedagoškega procesa in upamo si trditi, da so naši študenti zadovoljni s študijem in znanjem, ki ga pridobijo na fakulteti, kar nenazadnje dokazuje njihova uspešnost pri zaposlovanju v državah evropske unije. Pred nekaj leti smo uvedli strokovne specializacije na 5 področjih, in ponosni smo, da smo ravno v letošnjem letu dobili prve specializante veterinarske medicine. Skupaj z univerzo si prizadevamo za stalno izboljševanje kvalitete podiplomskega študija, ki ga zadnja leta izvajamo v medfakultetnem programu biomedicine. Na raziskovalnem področju naši dosežki stalno rastejo, in na nekaterih področjih smo v svetovnem vrhu na področju veterinarskih znanosti. Prizadevamo si za stalno izboljševanje strokovnega dela in na fakulteti izvajamo številne vrhunske strokovne posege in v prakso prenašamo in uvajamo izsledke našega raziskovalnega in razvojnega dela.

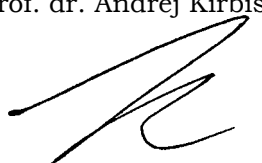
Veterinarska medicina se je v 60 letih močno spremenila. Od zdravljenja nalezljivih bolezni, ki so danes skoraj izkoreninjene, in skromnih posegov pri ekonomskih domačih živali na kmetijah, danes veliko več veterinarjev deluje na drugih področjih, kot so medicina psov in mačk, medicina eksotičnih živali, zdravljenje prostoživečih živali in živali v oborah, zdravljenje čebeljih družin in rib, in številna druga nova področja. Na Veterinarski fakulteti spremljamo in sodelujemo v tem razvoju. Tako imamo danes sodobno ambulanto za zdravljenje malih sesalcev, ptic in plazilcev, ravno v letošnjem letu smo odprli prenovljeno, sodobno stomatološko ambulanto za pse in mačke, ki je ena najsodobnejših v državah EU in željo po izobraževanju na tem področju pri nas kažejo številni študenti in veterinarji iz tujine.

V svetovni veterini se vedno bolj uveljavlja geslo »Eno zdravje«, ki govori o tem, da moramo za zdravje ljudi sodelovati vsi, ki se navezujemo na to področje, zdravniki, veterinarji in drugi. Tudi zaradi tega je pomembno, da slovenski veterinarji držimo skupaj, da sodelujemo, se pogovarjamo in skupaj skrbimo za razvoj stroke, ne glede na to, kje smo zaposleni, v zasebnih ambulantah in klinikah, v akademskih inštitucijah, v živilski industriji, farmaciji, v državni upravi ali drugje. Le skupaj smo lahko pravi ambasadorji naše stroke, ki je bila v zadnjih letih tudi večkrat tarča kritik, pogosto neupravičenih, zaradi našega vestnega dela, kot je bil pred kratkim primer v čebelarski aferi.

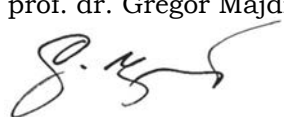
Zato smo vsi organizatorji kongresa veseli, da ste se 6. Slovenskega veterinarskega kongresa udeležili v tako velikem številu, kar kaže, da kljub občasnim nesoglasjih kot stroka držimo skupaj, da čutimo svojo pripadnost naši stroki in imamo željo po srečevanju in izmenjavi mnenj na takšnih dogodkih, kot je slovenski veterinarski kongres.

Z veseljem predsednik organizacijskega odbora in predsednik programskega odbora vse udeležence 6. Slovenskega veterinarskega kongresa pozdravlja in vam želiva uspešen kongres. Prepričana sva, da smo pripravili zanimiv program kongresa, na katerem si boste pridobili nova znanja z vaših strokovnih področij, se srečali s kolegi, izmenjali mnenja in izkušnje in obnovili prijateljstva, za katera imamo v sodobnem času vedno manj časa.

Predsednik organizacijskega odbora  
prof. dr. Andrej Kirbiš



Predsednik programskega odbora  
prof. dr. Gregor Majdič





# SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH

## SLOVENSKI VETERINARSKI ZBORNIK

Slov Vet Res 2016; 53 (Suppl 17)

### Plenarna predavanja / Plenary Lectures

---

<b>Bartha T.</b> A window to the future – Importance of accreditation and new trends in veterinary education .....	11
<b>Smulders FJM, Buncic S, Fehlhauer K, Huey RJ, Korkeala H, Prieto M, Steinhäuserova I.</b> Toward harmonization of the European food hygiene / Veterinary public health curriculum .....	12
<b>Mettenleiter TC.</b> Vector borne diseases: The present and future threat for Europe.....	13
<b>Aroch I.</b> Veterinary specialization and veterinary education .....	14

### Družne živali / Companion animals

---

#### Psi in mačke / Dogs and cats

<b>Aroch I.</b> The role of clinical pathology in modern veterinary practice and veterinary education .....	17
<b>Tozon N.</b> Veterinarska onkologija v veterinarski medicini in njen pomen za translacijsko medicino.....	18
<b>Pavlica Z.</b> Veterinary dentistry: Its importance in veterinary education and interdisciplinary research.....	19
Plavec T. Perinealne hernije – so vse zgolj šolski primeri?.....	20
Zakošek Pipan M, Plavec T. Piometra pri psih: sterilizirati ali ne? .....	26

#### Ptice, mali sesalci in plazilci / Birds, small mammals and reptiles

<b>Meredith A, Eatwell K.</b> The effect of diet on health and welfare of pet rabbits .....	32
---	----

### Ekonomske živali / Farm animals

---

#### Prežvekovalci / Ruminants

<b>Kirovski D.</b> Determination of blood variables thresholds in prediction of productive and reproductive performances in dairy cows: use of receiver operating characteristic (ROC) analysis .....	35
<b>Starič J.</b> Pristopi k obvladovanju obporodne hipokalcemije pri govedu .....	37
Brankovič J, Cotman M, Šmigoc J, Ježek J. Primer polymelie pri telici križanki s cikastim govedom.....	41
Ježek J, Kodermac P, Tušar J, Vergles Rataj A. Parazitoze pri drobnici .....	46
Knific T, Malovrh T, Potočnik M, Pretnar M, Krkovič M, Vodopija A, Prezelj J. Modeliranje širjenja kužnih bolezni: primer bolezni modrikastega jezika v Sloveniji.....	50
Cociancich V, Paller T, Toplak I. Dokaz primerov obolelih živali z mukozno boleznijo v Sloveniji .....	55
Ježek J, Nemeč M, Klinkon M, Starič J. Ugotavljanje subkliničnih presnovnih motenj krav molznic .....	59
Starič J, Očepek M, Miaunovic M, Ježek J, Krt B. Psevdotuberkuloza (kazeozni limfadenitis).....	63
Toplak I, Hostnik P, Grom J. Dve leti izvajanja prostovoljnega programa za priznanje statusa čreda prosta BVD v Sloveniji.....	68
Zabavnik Piano J, Cotman M, Ambrožič I, Juntas P. Genotipi gena za prionski protein pri ovcah z atipičnim praskavcem v Sloveniji .....	71
Žitnik Oitzl T, Rihtarič D, Toplak I. Določitev prevalence perzistentnih izločevalcev virusa BVD iz rutinsko testiranih serumskih vzorcev .....	75

## Prašiči / Pigs

<b>Štukelj M.</b> Spremembe v Slovenski prašičereji po vstopu v Evropsko unijo.....	80
Zakošek Pipan M, Mrkun J, Jakovac Strajn B, Pavšič Vrtač K, Pišlar A, Nemeč Svete A, Zrimšek P, Kos J. Biomarkerji v semenski plazmi kot faktorji napovedi kakovosti kratkotrajno hranjenega merjaščevega semena.....	84
Plut J, Golinar Oven I, Juntos P, Gider T, Štukelj M. Študija primera: prašičje epidemične driske (PED) na farmi prašičev pitancev v Sloveniji.....	87
Toplak I, Rihtarič D, Vengušt G, žele D, Hostnik P, Grom J. Izvajanje monitoringa na prisotnost virusa in protiteles afriške prašičje kuge med let 2014 in 2015 v Sloveniji.....	92
Žlabravec Z, Raspor Lainšček P, Rihtarič D, Toplak I. Prva ugotovitev in genetska karakterizacija prašičjih bokavirusov v Sloveniji.....	95

## Perutnina / Poultry

<b>Benčina D.</b> Hemaglutinini in nevraminidaze patogenih vrst rodu <i>Mycoplasma</i> .....	100
Ballarin-Perharia A, Jankovia D, Juršič Cizerl R, Podlesnik M, Zorman Rojs O, Krapež U, Slavec B, Zrimšek P. Evaluation of humoral immunity and production parameters after vaccination with live attenuated vaccines against Newcastle disease in commercial broilers and layers.....	103

## Nove tehnologije v veterinarstvu / New technologies in veterinary medicine

---

<b>Felix B,</b> Michelon D, Lombard B, Roussel S. Anses Listeria monocytogenes national & European programs: A road map toward, the use molecular typing for food safety.....	110
<b>Ocepek M,</b> Toplak I, Kušar D. Novejšje diagnostične metode v veterinarskem laboratoriju.....	111
Toplak I, Kušar D, Papić B, Gider T, Štukelj M, Kuhar U. Prva ugotovitev rekombinantnih sevov virusov PED pri prašičih z drisko v Sloveniji.....	113
Kuhar U, Kušar D, Papić B, Toplak I. Sekvenciranje naslednje generacije (NGS): testiranje vzorcev blata prašičev z drisko.....	116
Ipavec M, Kuhar U, Kušar D, Papić B, Koren S, Toplak N, Toplak I. Sekvenciranje celotnega genoma virusa prašičje epidemične diareje s tehnologijo Ion Torrent.....	120
Papić B, Kuhar U, Kušar D. Primerjava metod za opredelitev kakovosti in koncentracije knjižnic NGS.....	124
Zabavnik Piano J, Cotman M. Detekcija DNA predvidenega napadalca na kadavru ovce.....	129

## Varna hrana / Food safety

---

<b>Jevšnik M.</b> Vpliv kulture zagotavljanja varnih živil na živilsko-prehransko-oskrbovalno verigo.....	134
Dolenc J, Bukovec M, Močnik A, Šinigoj Gačnik K, Bajc Z. Določanje ostankov pomirjeval.....	137
Biasizzo M, Henigman H, Jamnikar Ciglencečki U, Kirbiš A, Vadnjal S. Ugotavljanje prisotnosti bakterij <i>Salmonella</i> spp. – primerjava postopkov.....	141
Biasizzo M, Vadnjal S, Henigman U, Jamnikar Ciglencečki U. Validacija postopka ugotavljanja prisotnosti bakterije <i>Clostridium difficile</i> v vzorcih surovega mesa.....	146
Siljanoski A, Ciglarič R, Pezdir T, Knific T, Šinigoj-Gačnik K. Detection of tetracycline residues in bovine milk following mastitis treatment.....	151
Toplak I, Rihtarič D, Barlovič S, Raspor Lainšček P, Kirbiš A. Ugotavljanje prisotnosti virusa hepatitisa E v vzorcih blata poginjenih prašičev v letih od 2011 do 2015 v Sloveniji.....	154

## Infekcijske bolezni in diagnostika / Infectious diseases and diagnostic

---

<b>Grilc Fajfar A,</b> Malovrh T. Bolezen modrikastega jezika v Sloveniji.....	158
Toplak I, Štukelj M, Rihtarič D. Prisotnost virusa PRRS pri poginjenih prašičih v obdobju od 2011 do 2016 v Sloveniji.....	162
Krt B, Vergles Rataj A, Gruntar I, Kotnik T. Lejšmanioza: preliminarni rezultati seroprevalence pri psih v Sloveniji.....	165

## Osnovne raziskave v veterinarstvu / Basic studies in veterinary medicine

---

<b>Juel Paulsen S</b> , Nohr Larsen J. Applications of the hybridisation based nanostring technology .....	172
Dolinar Paulie K, Rep M, Križnjak V, Meža V, Zadavec A. Naravni načini zatiranja parazitov.....	173
Blagotinšek K, Knuplež E, Vrecl M, Mohorič L, Majdič G, Kubale Dvojmoč V, Čeh K. Spolno specifično znotrajcelično sporočanje v matičnih celicah samcev in samic pssov po aktivaciji inzulinskega receptorja s pomočjo metode BRET <sup>2</sup> .....	176
Prem L, Kobal S, Trailovica S, Snoj T. Ali timol v razmerah in vitro zavira kontrakcije tankega črevesa, povzročene z acetilholinom? Preliminarna raziskava .....	182
Toplak I, Kušar D, Papia B, Kuhar U. Določitev prvega celotnega genoma virusa bovine virusne diareje v Sloveniji .....	188
Vidrih Š, Kubale Dvojmoč V. Karakterizacija morfoloških sprememb celic HEK-293 transfeciranih z mutantnimi oblikami receptorja za grelin (GHS-R1a) z oslajeno sposobnostjo vezave liganda ali aktivacijo sekundarnega sporočilnega sistema .....	189

## Dejavnosti na področju veterinarstva / Professional activities in veterinary medicine

---

<b>Černe M</b> . Veterinarska zdravila: nevarnost za zdravje in ocena tveganja .....	198
<b>Pirš T</b> . Zagotavljanje kakovosti v veterinarskih preskuševalnih laboratorijih.....	202
<b>Hrovatin B</b> , Potočnik M, Wernig JM, Arič T, Hari A. Razvoj informacijske tehnologije za podporo spremljanja in obvladovanja bolezni živali v Sloveniji .....	204
<b>Kuhar M</b> . Komuniciranje s strankami v veterinarski medicini.....	206

## Proste teme / Free topics

---

<b>Toplak I</b> , Jenčič V, Pislak Ocepek M, Jamnikar Ciglencečki U. Virusne okužbe čebeljih družin .....	208
Kobal S, Snoj T. Veterinarska stroka in njeno mesto pri delu Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke .....	210
Toplak I, Rihtarič D, Pislak Ocepek M, Jurič A, Vrničar Novak A, Matavž L, Jenko Rogelj M, Škof M, Skerbiš S, Lešnik V, Planinc I, Jenčič V. Ugotavljanje petih virusov v odmrlih čebeljih družinah v letu 2015 v Sloveniji .....	213

## Prehrana živali / Animal nutrition

---

<b>Nagl V</b> , Berthiller F, Hofstetter-Schähs U, Schatzmayr G. Mycotoxin biomarkers – Advances, challenges and limitations.....	218
Vrtač K, Ježek J, Starič J, Tavčar Kalcher G, Jakovac Strajn B. Cink, napredek in raziskovalne perspektive .....	219

## Kopitarji / Equines

---

<b>Kadunc Kos V</b> . Vrednotenje hematokrita in srčnega utripa med medikamentozno in operativno zdravljenimi primeri kolik pri konju .....	224
Hren M. Novosti na področju sindroma zakopitnice .....	226
Savić V, Barbić L, Vilibić-Čavlek T, Balenović M, Stevanović V, Listeš E, Savini G. Chickens and horses as sentinels for early warning system in prevention of human West Nile virus infections in Croatia .....	238

## Prostoživeče živali in divje živali v ujetništvu / Free living animals and wild animals living in captivity

---

<b>Krešimir S</b> , Džaja P, Radmilović, Konjević D. Wildlife forensics: Why veterinarians should participate in animal crime investigations.....	242
Hostnik P, Toplak I, Rihtarič D, Vengušt G. Ocena uspešnosti cepljenja lisic proti steklini .....	243



Dogodek poteka pod častnim pokroviteljstvom  
predsednika Republike Slovenije Boruta Pahorja.

**Plenarna predavanja**

Plenary Lectures

---

Krkinim veterinarskim zdravilom zaupajo  
veterinarji v več kot 50 državah po vsem svetu.



**Enroxil**<sup>®</sup>  
enrofloksacin



**marfloxin.**  
marbofloksacin



**FYPRYST**  
**COMBO**<sup>®</sup>  
fipronil, S-metopren



**Ecocid.S**  
vsestransko razkužilo

*Samo za strokovno javnost.*  
Pred uporabo preberite celotne povzetke glavnih značilnosti zdravil.  
Objavljeni so na [www.krka.si](http://www.krka.si).



*Skrb za zdravje živali  
je del nas*

Krka, d. d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, [www.krka.si](http://www.krka.si)



*Naša inovativnost in znanje  
za učinkovite in varne  
izdelke vrhunske kakovosti.*

# A WINDOW TO THE FUTURE – IMPORTANCE OF ACCREDITATION AND NEW TRENDS IN VETERINARY EDUCATION

Tibor Bartha

Universtiy of Veterinary Medicine Budapest, Hungary

bartha.tibor@univet.hu

University education will change dramatically in the next 15 year. Achievements of information technology will be extensively used which will require reshaping of the curriculum as well as will change the use of infrastructure available. Medical education, including veterinary training, is the only higher education area which invested quite a lot of effort in educational research in the past 50 years. In my presentation I would like to show the advantages using of good practices provided by educational research and the advantages of asking for external evaluation, in this case the EAEVE visitation.

The question is always the same: How can we train better veterinarians? First of all the universities must train students who are comparable on the labor market all over in Europe regardless which country provided the education for them. EAEVE visitation has an important role to help reaching this standard. Preparing the self-evaluation report already brings up the problems to deal with. The visitation itself focuses in details on all aspects of veterinary training. EAEVE experts not only examine the professional aspects but investigate how effective the quality control mechanisms are. Suggestions of the visiting team are rather important. Minor deficiencies help to alter the developmental plan of the university. Major deficiencies may lead to the temporary suspension of EAEVE accreditation and require instant intervention to adjust the existing system. University of Veterinary Medicine Budapest passed the EAEVE accreditation three times in the past 20 years. I would also like to show that this is doable process.

We have to realize that the demand from the work places, the expectations of the owners, and of the entire society increased towards a constantly renewing veterinary training. Furthermore, a new generation of veterinary students appeared. The university must give adequate responses to all challenges listed above. In my presentation I would also like to share some ideas how the veterinary schools might be able to keep their leading role in the future.

# TOWARD HARMONIZATION OF THE EUROPEAN FOOD HYGIENE / VETERINARY PUBLIC HEALTH CURRICULUM

Frans J.M. Smulders, Sava Buncic, Karsten Fehlhaber, Robert J. Huey, Hannu Korkeala, Miguel Prieto, Iva Steinhauserova

frans.smulders@vetmeduni.ac.at

Prompted by developments in the agri-food industry and associated recent changes in European legislation, the responsibilities of veterinarians professionally active in veterinary public health (VPH), and particularly in food hygiene (FH), have increasingly shifted from the traditional end-product control toward longitudinally integrated safety assurance. This necessitates the restructuring of university training programs to provide starting competence in this area for veterinary graduates or a sub-population of them. To date, there are substantial differences in Europe in the way in which graduate programs in FH/VPH are structured and in the time allocated to this important curricular group of subjects. Having recognized this, the European Association of Establishments for Veterinary Education (EAEVE) recently instituted a working group to analyze the current situation, with a view to produce standard operating procedures allowing fair and transparent evaluations of universities/faculties constituting its membership and in concurrence with explicit European legislation on the professional qualifications deemed necessary for this veterinary discipline. This article summarizes the main conclusions and recommendations of the working group and seeks to contribute to the international efforts to optimize veterinary training in FH/VPH.

**Key words:** food hygiene; veterinary public health; graduate education; European harmonization

Presentation is based on the full paper in *JVetMedEduc*  
*JVME* 39(2) 2012, AAVMC, doi:10.3138/jvme.0711.078R

## VECTOR BORNE DISEASES: THE PRESENT AND FUTURE THREAT FOR EUROPE

Thomas C. Mettenleiter

Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany

ThomasC.Mettenleiter@fli.bund.de

Vector borne diseases threatening food-producing animals in Europe have in the past been mainly restricted to areas around the Mediterranean basin providing climatic conditions favourable for arthropod vector populations. Recent incidents such as the first appearance of bluetongue virus (BTV serotype 8) north of the Alps, the current epidemic of BTV-4 as well as the discovery and Europe-wide spread of Schmallenberg Virus, all transmitted by indigenous species of insects with apparently excellent vector competence, demonstrate that this picture is changing. Arthropod vector populations are expanding their habitats as exemplified by the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* or the Japanese bush mosquito *Aedes japonicus*, but also by the spread of local vectors such as ticks into hitherto unpopulated areas. This change in pattern of infectious diseases from endemic to epidemic with the potential to transform into new endemicity is influenced by globalization of travel and commerce, alterations in land use, increase in livestock populations as well as climate change. It presents new challenges for the veterinary community which can only be met using a combined 'One Health' approach which includes all stakeholders from human and veterinary medicine, biology, environmental protection etc. Although we are unable as yet to predict reliably and in detail the future threats, several basic principles are apparent which need to be taken into account for risk assessment and preparedness.

## VETERINARY SPECIALIZATION AND VETERINARY EDUCATION

Itamar Aroch

Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, P.O. box 12, 761001, Israel

itamar.aroch@mail.huji.ac.il

Specialization in the different fields of human medicine has been established over 110 years ago. It has resulted in advancement of clinical practice and research, and student education. Recognized veterinary specialty organizations (RVSOs), have followed 50 years later in the USA. The Council of Education (COE) and the AMVA approved the criteria for applying to the American College of Veterinary Pathology (ACVP) in 1950, with more colleges to follow since. In 1973, the ACVIM received probationary approval from the AVMA. Currently, there are 22 AVMA-RVSOs, comprising 40 distinct specialties, with over 11,000 diplomates in one or more of these. The European Association of Veterinary Specialization (EAVS) was founded in 1990. In 1990-1, a liaison committee was formed, and developed a harmonized approach to transnational specialization in Europe and constitutions and by-laws for forming specialist Colleges, and interim regulations for specialist recognition and training. It defined the clear distinction between interest or expertise in a particular subject and the veterinary specialist qualification. Agreement was reached that a veterinary specialist qualification could only be based upon substantial and measurable additional training. In 1992, the Advisory Committee on Vocational Training (ACVT) adopted the recommendations for an organization of veterinary specialization. The EBVS was set up in 1993, to coordinate veterinary specialization in Europe. This enabled the European veterinary specialist Colleges that were being formed, with their own independent governing body, to develop further. Since then, founding diplomates were being appointed and qualifying examinations were starting to be held.

**Družne živali**

Companion animals

---

**Psi in mačke**

Dogs and cats



# Popoln, uravnotežen sistem prehrane

Hrana za pse in mačke iz naravnih sestavin visoke kakovosti.

ITALIAN  
FORMULA



DISTRIBUTER ZA FARMINO:

**DJ PLUS d.o.o.**

Ob Savinji 5, 3313 Polzela

Tel: 03/ 70 36 380

E-mail: info@djplus.si



Happy pet. Happy you.

# THE ROLE OF CLINICAL PATHOLOGY IN MODERN VETERINARY PRACTICE AND VETERINARY EDUCATION

Itamar Aroch

Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, P.O. box 12, 761001, Israel

itamar.aroch@mail.huji.ac.il

Veterinary clinical pathology (VCP), the science of veterinary laboratory medicine, integrates the fields of hematology, clinical chemistry, cytology, endocrinology, immunology, and recently, molecular biology as well. Conversely, in human medicine, these subjects often fall within different disciplines, under supervision of different specialists and specialized laboratories. For example, hematology is handled by clinical hematologists, while endocrinology testing is done in specialized endocrinology laboratories, supervised by clinical endocrinologists. In modern veterinary practice, VCP education must encompass all the above-mentioned fields, because of the more limited size of veterinary facilities, and because practicing veterinarians more often provide general medicine, and therefore, they sample their patients, and either perform in-house laboratory testing, or send their samples to reference laboratories, where more advanced tests are done. In case of the former, veterinarians must be educated in VCP to a level that will allow them to correctly interpret the results, to have adequate quality-assurance methods and introduce new relevant laboratory techniques. In the latter cases, veterinarians should be able to interpret the results correctly in context of the ill animal patient, because most reference laboratories provide limited interpretation of the results. Laboratory testing of animals, has become standard in pet-animals (e.g., dogs and cats), and is also common practice in food-animal medicine. VCP education should be based on comprehensive basic biochemistry, physiology and pathology knowledge, and be an essential component in the DVM studies, and should be practiced through discussions and rounds during the clinical year, on a daily basis, to achieve adequate proficiency.

# VETERINARSKA ONKOLOGIJA V VETERINARSKI MEDICINI IN NJEN POMEN ZA TRANSLACIJSKO MEDICINO

Nataša Tozon

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

natasa.tozon@vf.uni-lj.si

Veterinarska onkologija se ukvarja s preprečevanjem, ugotavljanjem in zdravljenjem rakastih obolenj, ki predstavljajo najpogostejši vzrok pogina ali humane usmrtitve živali. Pogosto je ob napredovanju bolezni namen stroke izboljšati kakovost življenja in podaljšati preživetje. Predvsem za uspešnost zdravljenja je izjemnega pomena medsebojno sodelovanje strokovnjakov s področja bazičnih ved, predkliničnih in različnih kliničnih področij veterinarske medicine, ki bistveno prispevajo h kompleksnemu pristopu zdravljenja in oskrbe vsakega individualnega bolnika. Ker se relativno mlada stroka intenzivno razvija, je za vsakega onkologa izjemnega pomena sprotno spremljanje novih dognanj in pristopov. Tako v humani, kot še posebej v veterinarski onkologiji, je bolnike z napredovalo boleznijo, za katero ni znanega uspešnega standardnega zdravljenja, smiselno vključevati v klinične študije, ki so v veterinarski onkologiji pomemben del translacijske medicine.

Veterinarska onkologija je bila že od samega začetka močno vpeta v raziskave na področju humane onkologije, saj živali predstavljajo pomemben model za raziskave potencialnih etioloških dejavnikov, kot posledice delitve življenjskega prostora, nastanek in razvoj bolezni ter načinov zdravljenja.

Na VF UL se je naše strokovno in raziskovalno delo na področju veterinarske onkologije dokončno uveljavilo z letom 2007 z uvedbo izbirnega predmeta Klinična onkologija v veterinarski medicini na dodiplomskem študiju, ki ga je do danes absolviralo preko 100 študentov. Na Kliniki za male živali se vsakoletno izobražuje in praktično usposablja več podiplomskih študentov različnih naravoslovnih in tehničnih smeri (študij Biomedicine - Metode zdravljenja onkoloških obolenj v veterinarski medicini in Specializacija na nacionalni ravni – veterinarska medicina psov in mačk).

Poleg razvoja strokovnega dela pa že več kot 20 let uspešno sodelujemo z Onkološkim inštitutom v Ljubljani, kar se kaže v številnih znanstvenih objavah in vodilni vlogi na področju uspešne translacije elektrokemo in elektrogenske terapije.

## Veterinary oncology: Its place in veterinary and translational medicine

Veterinary oncology covers prevention, diagnosis and treatment of cancers, which are the most common cause of death or euthanasia in animals. The purpose of the treatment, especially in cases of an advanced disease, is often to improve the quality of life and prolong survival. To improve the outcomes of the treatment, it is of an utmost importance for the experts from different fields of basic and preclinical sciences to collaborate with veterinary

clinicians and hence contribute to the success of the complex treatment and care for each individual patient.

As a relatively young profession, veterinary oncology is developing intensively; it is, therefore, extremely important that oncologists continually follow recent advances in management of oncologic patients. In human, and even more so in veterinary oncology, it is very important that patients with advanced disease, for which no known effective standard treatment currently exist, are possibly enrolled in the clinical studies.

Veterinary oncology has always been an important part of the research in the field of human oncology, as animals are considered an excellent model in studies on potential etiological factors, as they share the environment with humans, the emergence and development of diseases and treatments.

At VF UL veterinary oncology was officially established in 2007 with the introduction of Clinical Oncology in veterinary medicine as an elective part of the curriculum at the undergraduate level. Over 100 students have since attended the course. Small Animal Clinic Oncology department also hosts several postgraduate students annually (postgraduate program in Biomedicine - Methods of treatment of oncological diseases in veterinary medicine - and specialization program at the national level – Canine and feline veterinary medicine).

In addition to the development of our clinical activities in the field of veterinary oncology, we have been collaborating with the Institute of Oncology in Ljubljana for more than 20 years. The fruitful research collaboration has resulted in numerous scientific publications and leadership in successful translation of electrochemotherapy and electrogene therapy.

# VETERINARY DENTISTRY: ITS IMPORTANCE IN VETERINARY EDUCATION AND INTERDISCIPLINARY RESEARCH

Zlatko Pavlica

Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Slovenia

zlatko.pavlica@vf.uni-lj.si

The realization that the mouth is part of the body and thus that oral and general health are interdependent is increasingly appreciated. Since animals cannot express their needs, regular oral and dental care by veterinarians is of utmost importance and the veterinarian should be able to provide this care as the first day competence. One of the first steps in becoming a veterinary dentist is to complete a veterinary degree program. In Europe, this typically takes five to six years beyond the time invested in obtaining a bachelor's degree. Following completion of their DVM degree, veterinarians interested in dentistry should continue with a 1-year rotating internship or equivalent in order to apply for a residency in veterinary dentistry. Only after completion of a residency program, which can take up to 6 years, one becomes eligible to seek dentistry board certification. However, no standard residency programs fulfilling criteria of European College of Veterinary Dentistry currently exist at European universities.

Periodontal disease is the most common chronic infectious disease of humans and dogs that locally affects tooth supporting structures leading to tooth loss. In addition there is increasing evidence of an association between periodontal disease and various systemic diseases as bacteria and the inflammatory products can be disseminated systemically. Periodontitis associated upregulation of systemic inflammatory mediators is described, but the data on systemic nitroxidative stress in humans and animals with periodontal disease are missing. Most of the data indicate that periodontitis can stimulate inflammation in distant tissues. However, some recent data suggest, that also in the very early phases of periodontal disease, local and systemic elevation of pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins occurs, although the significance of this needs to be clarified further.

## Veterinarska stomatologija - pomen v izobraževanju in interdisciplinarnih raziskavah

Perry R. Final year veterinary students' attitudes towards small animal dentistry: a questionnaire-based survey. *J Small Anim Pract.* 2014;55(9):457-64.

Nemec A, Petelin M, Pavlica Z. Systemic inflammatory host response to periodontopathogenic bacteria in the oral cavity : from experimental to clinical studies. In: Mendez -Vilas A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, (Microbiology book series, 4). Badajoz: Formatex Research Center, 2013: 1926-1933.

Pavlica Z, Nemec A. Periodontal disease: from the whole body perspective. *EJCAP - Vol. 20 - Issue 3 December 2010*

# PERINEALNE HERNIJE – SO VSE ZGOLJ ŠOLSKI PRIMERI?

Tanja Plavec

Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

tanja.plavec@vf.uni-lj.si

Retrospektivna študija zajema paciente, pri katerih smo na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete v zadnjih 6 letih diagnosticirali in operirali perinealno hernijo. Vključenih je 26 intaktnih oziroma pozno kastriranih samcev, ki so kazali znake od 3 dni do 52 tednov, in sicer: tenezme, oteklino v okolici anusa, zaprtje, drisko, bruhanje, oteženo uriniranje, hematohezijo ali zgolj lizanje perianalnega področja. V času diagnoze je 8 živali imelo obojestransko perinealno hernijo, 13 desnostransko in 5 levostransko. Opravljenih je bilo 30 kirurških posegov – herniorafij, pri 25 samo s transpozicijo internega obturatorja, pri petih pa dodatno z uporabo polipropilenske mrežice. Skupni delež komplikacij po posegu je bil 38,5 %, samo v treh primerih (11 %) je prišlo do recidive. Najpomembnejša komplikacija je bilo napenjanje/oteženo blatenje po posegih kljub ustrezni opori medenične prepone.

Povprečen čas spremljanja živali po posegu je bil dve leti, v tem času je bilo 84,6 % lastnikov zelo zadovoljnih z rezultati posega.

Ključne besede: perinealna hernija; kastracija; komplikacije

## Uvod

Perinealna hernija se pojavlja pri 0,1 – 0,4 % psov, skoraj izključno pri intaktnih starejših psih (ti predstavljajo 83 – 93 % obolelih živali) med sedmim in trinajstim letom starosti. Predisponirane pasme so: pekinezerji, bostonski terierji, nemški bokserji, kodri, flandrijski govedarji in staroangleški ovčarji (1).

Natančen vzrok bolezni je neznan, verjetno gre za več faktorjev, ki vplivajo na njen razvoj. Mednje prištevamo prirojeno predispozicijo, rektalne nepravilnosti, hormonsko neravnovesje, povečanje prostate, strukturne nepravilnosti medenične prepone ter tudi dolgotrajno zaprtost s posledičnim stalnim napenjanjem, kateremu (lahko) sledi oslabelost medenične prepone (2). Slednje je lahko tudi končna posledica zaradi napenjanja ob dalj časa trajajočem vnetju mehurja, obstrukciji spodnjih sečil (Slika 1), vnetju paranalk, obzadnjičnem vnetje ali driski. Možna je tudi povezava med netravmatskimi ingvinalnimi hernijami in perinealno hernijo ter pojav perinealne hernije zaradi povečanega pritiska v trebuhu npr. zaradi brejosti pri psicah (1).

Znana predispozicija pri intaktnih samcih nakazuje na vpliv androgenih hormonov pri nastanku hernije, zato se ob korekciji hernije večinoma svetuje kastracija. Ta zmanjša pojavnost recidiv za 2,7× v primerjavi z intaktnimi psi. Hkrati ima med 25 in 59 % psov s perinealno hernijo zraven še katero od bolezni prostate; tkivo in prostatične ciste vsebujejo večje količine hormona relaksina, ki naj bi vplival na razrahljanje mišic in vezi medenične prepone. Ker pa niso vsi raziskovalci dokazali povezave med prostatičnimi boleznimi in komplikacijami po perinealni herniorafiji, ter ker recidive pri psih z normalno prostato niso

odvisne od kastracijskega statusa, nekateri priporočajo kastracijo ob herniorafiji samo v primeru bolezni/sprememb prostate, mod in/ali ob pojavu perianalnih adenomov (1).

Perinealne hernije se pojavljajo večinoma enostransko (47 – 66 %), v tem primeru je večkrat prizadeta desna stran (59 – 84 %); lahko so obojestranske v času diagnoze ali psi razvijejo hernijo na drugi strani kasneje (1).

## Material in metode

Retrospektivna študija je zajela trideset perinealnih herniorafij, izvedenih v zadnjih šestih letih pri 26 pacientih Klinike za male živali Veterinarske fakultete. Predoperativno smo s sodelavci ob prvem pregledu postavili diagnozo in opravili hematološke ter biokemijske preiskave, odvisno od anamneze in kliničnega pregleda pa še ultrazvočno in/ali rentgensko preiskavo. Priporočili smo mokro dietno prehrano z višjo vsebnostjo vlaknin, mlekom ali jogurtom, namočenimi zmletimi lanenimi semeni in zdravljenje z laktulozo (0,5 ml/kg) za doseganje dveh do treh mehkih, formiranih iztrebkov dnevno. Kirurška obravnava je sledila glede na nujnost in lastnikovo željo.

Živali so bile pred posegom na postu 12 ur, zadnjih 24 ur niso dobile dietnih pripravkov in laktuloze. Ob uvodu v splošno anestezijo so psi prejeli antibiotika linkomicin (Lincocin, Pfizer, Belgija) 10 mg/kg IV in gentamicin (Gentamicin, Krka, Slovenija) 5 mg/kg IM. Pred posegom je v splošni anesteziji sledilo še manualno praznjenje rektuma, praznjenje in prepiranje paranalk, namestitev vlažnega zloženca v rektum, namestitev tobačnega šiva na anus ter priprava primerne kirurškega polja. V kirurški dvorani je bil pacient nameščen v trebušni položaj z dvignjenim in podloženim zadnjim delom telesa ter opravljena herniorafija perinealne hernije s pomočjo transpozicije internega obturatorja z/ brez uporabe polipropilenske mrežice. Na koncu so bili psi še kastrirani.

## Rezultati

Vsi psi so bili samci, šlo je za živali povprečne starosti 8,88 let (mediana: 8,54 let; razpon: 4,42 – 13,08 let) in povprečne mase 17,6 kg (mediana: 14,08 kg; razpon 4,16 – 39,55 kg). Pasemska razporeditev je bila sledeča: pet mešancev, po dva maltežana, pekinezerja, tibetanska terierja, škotska ovčarja in dva psa pasme Coton de tular. Ostale pasme so bile zastopane po enkrat: nemški ovčar, nemški bokser, samojed, rotvajler, koder, beli zahodnovišavski terier, sibirski haski, jorkširski terier, kitajski goli pes, koker španjel in beagle.

Od 26 prizadetih psov, jih je bilo v času diagnoze perinealne hernije 24 intaktnih, dva sta bila kastrirana en oziroma štiri mesece pred diagnozo zaradi povečane prostate. Od sedemnajst psov, pri katerih je bila delana ultrazvočna preiskava trebuha, je bila pri dvanajstih potrjena povečana prostata, pri 10 psih so bile v prostati vidne cistične spremembe. Pri treh psih je šlo za retrofleksijo mehurja v hernijo, pri enem za urolitiazio z obstrukcijo sečnice (Slika 1), pri enem za izpad rektuma in pri enem za obojestransko ingvinalno hernijo.

Klinični znaki, ki so se pri psih pojavljali od 3 dni do 52 tednov, so prikazani v Tabeli 1.

V času diagnoze je pri 8 živalih (31 %) šlo za obojestransko perinealno hernijo (Slika 2), pri 13 (50 %) za desnostransko in pri 5 (19 %) za levostransko. Pri štirih psih se je hernija na drugi strani razvila kasneje – čez 2 tedna pri dveh psih (en operiran 8 tednov po prvem posegu), čez 2 leti (diagnosticirano v začetku maja 2016) in 6,5 let (so se odločili za evtanazijo).

Vsi intaktni psi razen enega, kjer lastniki kastracije niso želeli, so bili ob posegu kastrirani. V primeru bilateralnih hernij je, razen v enem primeru, najprej sledila korekcija

ene (slabše) strani. Drugi poseg je bil opravljen z zamikom 4 – 6 tednov (štiri živali); dva z drugo minimalno hernijo nista imela težav; dva pa se za drug poseg nista odločila zaradi finančnih razlogov. Tako je bilo skupaj opravljenih 30 herniorafij, pri vseh z metodo s transpozicijo internega obturatorja, pri petih psih (z velikimi defekti in izrazito atrofiranimi mišicami medenične prepone) pa tudi s sočasno uporabo polipropilenske mrežice. Pri dveh psih (2/26; 7,7 %), kjer v prvi fazi mrežica ni bila uporabljena, je prišlo do recidive, v obeh primerih je bila ob ponovnem posegu uporabljena polipropilenska mrežica; en pes z obojestransko operirano perinealno hernijo je bil ob pojavu recidive evtanaziran. Ob posegih dreni rutinsko niso bili uporabljani. Ostale komplikacije, ki so se pojavile, so bile: občasno ali konstantno oteženo blatenje pri štirih (15%) ter prolaps rektuma pri treh psih (11,5 %). Po enkrat (3,8 %) so se pojavili oslavljen sfinkter s prehodno inkontinenco blata, oteklina na mestu herniorafije s sistemsko levkocitozo, ezofagitis, inkontinenca urina in pri psu z ingvinalnima in perinealno hernijo izrazite podplutbe. Skupaj je pri 10 psih (38,5 %) prišlo do zgodnjih ali poznih komplikacij.

Spremljanje živali po posegu je trajalo od enega do 76 mesecev (povprečno 28 mesecev; srednja doba spremljanja: 23 mesecev).

V času zaključka študije je bilo 12 psov mrtvih (v 10 primerih brez povezave s perinealno hernijo, gastrointestinalnim in/ali spodnjim urinarnim traktom), ostali so bili še živi in brez težav. Razen pri dveh, kjer je bila opravljena bilateralna herniorafija in so težave z blatenjem vztrajale, so bili vsi zelo zadovoljni s posegom in kliničnim stanjem pacienta.

## Razprava

Podatki o spolu, reprodukcijskem statusu in starosti v retrospektivni študiji se skladajo s podatki predhodno izvedenih raziskav. Tudi klinični znaki, delež povečane prostate in pojavnost perinealne hernije na obeh oziroma na levi/desni strani se sklada s predhodnimi navedbami (2-5).

Ob povprečni dobi spremljanja več kot dve leti so se pri 10 psih (38,5%) pojavile komplikacije. V nasprotju s tem so Sjollema in van Sluijs (3) ob uporabi transpozicije internega obturatorja poročali o 45 % razvoju infekcij rane; 15 % inkontinence blata, 7 % izpada rektuma ter 5 % pojava inkontinence urina v zgodnjem pooperativnem obdobju. Od poznih komplikacij pa o pojavu fistul v perianalni regiji pri 7 % psov (pri psih z infekcijo rane), ter o recidivah v 3 % primerov. Recidive v pričujoči študiji so se pojavile v 11,5 % primerov. Shaughnessy and Monnet (2) so ob podobnem številu pacientov in srednji dobi spremljanja 345 dni po posegu, ugotovili pojav recidiv v 27,4 % primerov, pri treh pacientih pa pojav hernije na drugi strani. V raziskavi, kjer so pri 59 psih za korekcijo perinealne hernije uporabili polipropilensko mrežico, so ugotovili 5,6 % infekcij kirurške rane in 12,5 % recidiv (5).

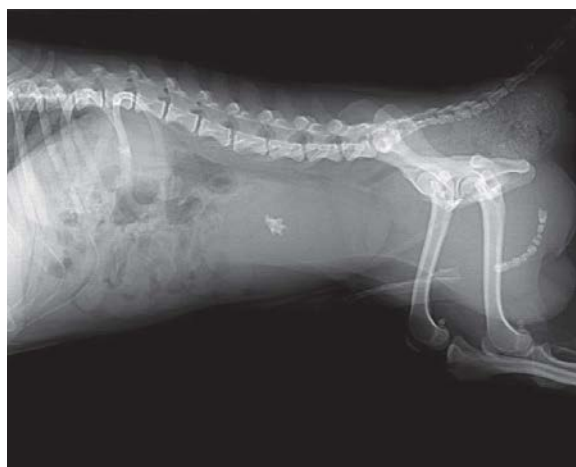
Pojav in delež komplikacij je v različnih raziskavah različen, pojav recidiv pa za obe metodi sorazmerno majhen.

Pri pacientih, vključenih v retrospektivno študijo, sta bili uporabljeni obe metodi, odločitev o uporabi metode je bila sprejeta intraoperativno. Rezultati so primerljivi s predhodno izvedenimi raziskavami, skupni delež komplikacij ob srednji dobi spremljanja 23 mesecev pa je sorazmerno nizek.



Tabela 1: Klinični znaki pri 26 psih s perinealno hernijo

Klinični znak	Število psov (%)
Tenezmi	21 (70)
Oteklina ob anusu	12 (40)
Obstipacija/zaprtje	7 (23)
Driska	5 (17)
Bruhanje	3 (10)
Oteženo uriniranje	3 (10)
Krvavo blato	1 (3)
Lizanje okrog anusa	1 (3)



Slika 1: Na razvoj perinealne hernije lahko vplivajo kronična vnetja in/ali obstrukcija spodnjih sečil. Na rentgenogramu vidimo večji urolit v mehurju, nekaj manjših v sečnici ter blato v razširitvi rektuma v področju perinealne hernije pri pekinezerju z levostransko perinealno hernijo (Vir: Arhiv KMŽ)



Slika 2: Pri mnogih psih je enostransko ali obojestransko vidna oteklina v okolici anusa

## Reference

1. Aronson LR. Rectum, anus, and perineum. In: Tobias KM, Johnston SA, eds. Veterinary surgery, Small animal. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012: 1564-600.
2. Shaughnessy M, Monnet E. Internal obturator muscle transposition for treatment of perineal hernia in dogs: 34 cases (1998-2012). J Am Vet Med Assoc. 2015; 246: 321-6.
3. Sjollem BE, van Sluijs FJ. Perineal hernia repair in the dog by transposition of the internal obturator muscle. II. Complications and results in 100 patients. Vet Q. 1989;11:18-23.
4. Hosgood G, Hedlund CS, Pechman RD, Dean PW. Perineal herniorrhaphy: perioperative data from 100 dogs. J Am Anim Hosp Assoc. 1995; 31: 331-42.
5. Szabo S, Wilkens B, Radasch RM. Use of polypropylene mesh in addition to internal obturator transposition: a review of 59 cases (2000-2004). J Am Anim Hosp Assoc 2007; 43: 136-42.

## Perineal hernia – are they all typical?

The retrospective study looked at the dogs that were diagnosed and surgically treated at the Small Animal Clinic of Veterinary Faculty for perineal hernia in last six years. Twenty-six intact or late castrated males with clinical signs: tenesmus, perineal swelling, obstipation, diarrhea, vomiting, stranguria, hematochezia and licking of the perianal region were included. Clinical signs lasted from three days to 52 weeks. At the time of diagnosis 8 dogs had bilateral perineal hernia, the rest had unilateral hernia, in 13 of them, right side was affected. Thirty herniorrhaphy procedures were performed, 25 with the transposition of the internal obturator only, and in five polypropylene mesh was used as an adjunct to that procedure. Complication rate was 38,5 %, recurrence was noted in three dogs (11 %). The most important complication was continuous tenesmus/obstipation despite the appropriate support of the pelvic diaphragm.

Average follow up of the patients was two years, after that time 84,6 % of the owners were very satisfied with the results.

Key words: perineal hernia; castration; complications

# PIOMETRA PRI PSICAH: STERILIZIRATI ALI NE?

Maja Zakošek Pipan<sup>1\*</sup>, Tanja Plavec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, <sup>2</sup>Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

maja.zakosekpipan@vf.uni-lj.si

Piometra oz. gnojno vnetje maternice je vnetna in infekcijska bolezen, ki se običajno razvije pri odraslih, nesteriliziranih psicah, med ali takoj po lutealni fazi estrusnega ciklusa. Čeprav je ovariohisterektomija najboljša oblika zdravljenja, saj ima tako kurativen kot preventiven učinek, je kirurški poseg zaradi potrebe po anesteziji pri določeni populaciji psic lahko tvegan. Poleg tega povzroči odstranitev rodil trajno neplodnost psice. V kolikor ima psica visok reprodukcijski potencial, je primerna za razplod, in je ne ogrožajo hujše življenjsko ogrožajoče bolezni (npr. septikemija, endotoksemija, neustrezno delovanje notranjih organov), se lahko odločimo za konservativno zdravljenje piometre. Osnovni cilj tovrstnega zdravljenja je zmanjšati progesteronsko stimulacijo maternice, ki v njej ustvarja ustrezno okolje za razvoj bakterij. To dosežemo z aplikacijo zdravil, ki povzročijo regresijo rumenega telesa in s tem izločanje progesterona ali blokirajo progesteronske receptorje v maternici.

Ključne besede: piometra; psica; konservativno zdravljenje; kirurško zdravljenje

## Uvod

Za piometro je značilno kopičenje gnojnega izcedka v svetlini maternice in je bolezen nesteriliziranih psic, starejših od 8 let. Razvije se pri 23-24% intaktnih psic do 10. leta starosti (1), pojavi se lahko tudi pri mlajših in zelo mladih psicah (od 4 mesecev naprej). Bolezen se najpogosteje pojavi po estrusu, ko je psica v lutealni fazi ciklusa. Nastane zaradi hormonskega neravnovesja oziroma kot posledica neustreznega odgovora epitelnih celic maternice na normalne koncentracije estrogenov in progesterona, kar olajša pritrjevanje bakterij, njihovo kolonizacijo in rast. Piometra se lahko razvije v življenje ogrožajoče obolenje, kar narekuje takojšnje in agresivno zdravljenje. V večini primerov se odločamo za ovariohisterektomijo (OVH), ki omogoči odstranitev prizadetega organa in prepreči ponovitev bolezni po operaciji. V primerih, ko psica predstavlja izjemen genetski material, je reprodukcijsko aktivna, ali ko kirurški poseg zaradi stanja psice oziroma drugih obolenj ni mogoč ali predstavlja preveliko nevarnost za psico, uporabimo konservativno zdravljenje (2).

## Kirurško zdravljenje

Piometro najpogosteje zdravimo s kirurško odstranitvijo maternice in jajčnikov, saj tako v trenutku odstranimo gnojno vsebino maternice in zatremo izločanje endotoksinov. OVH tako omogoča hitro okrevanje in minimalno tveganje za ponovitev bolezni; hkrati pa izničimo tveganje za nastanek novotvorb jajčnika, maternice ter nezaželene brejosti.

Pred samim kirurškim posegom moramo poskrbeti za stabilizacijo psice s korekcijo

dehidracije, elektrolitov in acido-baznega neravnovesja ter aplikacijo širokospektralnega antibiotika; v primeru znakov sindroma sistemskega vnetnega odgovora pa za intenzivno podporno nego in skrbno spremljanje pacientke.

Sam poseg se rahlo razlikuje od istovrstnega posega pri zdravih, mladih živalih. Suspenzorni ligament je zaradi teže maternice običajno raztegnjen, žile v materničnem oporku pa polnejše, zaradi česar jih je potrebno podvezati. Zaradi lažjega rokovanja s sorazmerno krhko maternico in njenim oporkom naredimo nekoliko daljši rez, preostanek trebušne votline pa pred morebitnim predrtjem zaščitimo s trebušnimi kompresami.

V primeru kontaminacije trebušne votline ali generaliziranega peritonitisa, moramo trebuh obilno sprati s fiziološko raztopino ter po potrebi zdraviti z odprto ali zaprto drenažo trebuha.

Možne pooperativne komplikacije so: anestezijske komplikacije, krvavitve, peritonitis, odprtje rane, nepopolna odstranitev jajčnika, »štrcelj« piometra ter nastanek drenažnega trakta (1).

## Konservativno zdravljenje

Konservativnega zdravljenja ne smemo izvajati pri psicah z vročino ali pri podhlajenih psicah ter pri psicah s peritonitisom. Uspešnost konservativnega zdravljenja je odvisna od kliničnega stanja psice, prisotnosti/odsotnosti vnetja maternice in cist na jajčnikih ter oblike piometre – odprta (Slika 1) ali zaprta. Pri zaprti piometri (Slika 2) se namreč poveča nevarnost komplikacij, med katerimi je na prvem mestu ruptura maternice.

Na voljo je več različnih protokolov. Ne glede na izbiro protokola psi vedno damo ovratnik, da preprečimo lizanje izcedka iz nožnice, začnemo zdraviti z antibiotiki, da preprečimo septikemijo, in poskrbimo za ustrezno tekočinsko terapijo, s katero korigiramo hipovolemijo (hipovolemični in distribucijski šok) in dehidracijo ter poskrbimo za nadomeščanje dnevnih potreb po tekočini (2).

### *Prostaglandini (PGF<sub>2a</sub>)*

Zaradi svojega luteolitičnega in uterotoničnega delovanja se za zdravljenje piometre najpogosteje uporabljajo PGF<sub>2a</sub>. Uporabljamo jih za zdravljenje vnetja maternice in odprte piometre pri psicah, ki imajo normalno delujoče ledvice in jetra in pri katerih ni prisotna cistična hiperplazija maternice. Aplikacija prostaglandinov pri zaprti piometri predstavlja veliko tveganje za pojav bakterijskega peritonitisa, saj se poveča možnost rupture maternice in/ali prehajanja gnojne tekočine po materničnih rogovih v jajčnikovo vrečko in posledično v trebušno votlino. Zdravljenje je uspešnejše pri piometrah, ki se pojavijo vsaj pet tednov po začetku lutealne faze, saj je rumeno telo s staranjem bolj občutljivo na delovanje prostaglandinov. Zato je v prvih petih tednih za uspešno zdravljenje potrebno uporabiti višje doze prostaglandinov, kar pa vpliva na pojav hujših stranskih učinkov, kot so bolečine v trebuhu, bruhanje, driska, povišan srčni utrip, nemir, vročina, sopenje, oteženo dihanje in povečano slinjenje, ob zelo visokih in večkratnih odmerkih pa tudi srčne aritmije in anafilaktični šok (1,2).

### *Dopaminski agonisti*

Uporabljamo jih v kombinaciji s prostaglandini z namenom zmanjšanja stranskih učinkov, ki jih povzročijo prostaglandini. Dopaminski agonisti namreč zavirajo izločanje prolaktina

iz hipofize. Prolaktin pa ima luteotropno delovanje. Večkratna aplikacija prolaktinskih inhibitorjev torej povzroči velik padec v koncentraciji plazemskega progesterona. Na voljo sta dva pripravka: bromokriptin in kabergolin. Za zdravljenje najpogosteje uporabljamo kabergolin, saj ima v primerjavi z bromokriptinom manj stranskih učinkov (2).



Slika 1: Značilen gnojni izcedek iz nožnice pri odprti piometri



Slika 2: Močno povečana in s tekočino napolnjena maternična rogova izpostavljena v kirurškem polju, v oporku vidni hematomi. Motnje v strjevanju krvi lahko spremljajo gnojno vnetje maternice

### *Antagonisti progesteronskih receptorjev – aglepristone*

V zadnjih desetih letih so raziskovalci preučevali uporabo antagonistov progesteronskih receptorjev z namenom zdravljenja odprte in zaprte piometre. Zaradi številnih izredno pozitivnih izsledkov in odsotnosti stranskih učinkov, se zadnjih nekaj let uspešno uporabljajo tudi v praksi. Njihov učinek je posledica kompetitivne vezave na progesteronske receptorje, kar prepreči vezavo progesterona in posledično njegovo delovanje (3). Vendar omenjeno zdravilo ne povzroča krčenja maternice, zaradi česar je omejeno izločanje gnojne vsebine iz maternice in ga je potrebno včasih kombinirati s prostaglandini. Uspešnost zdravljenja samo z aglepristonom (Alizin, Virbac, Francija) je 60 %, v kombinaciji z zelo nizkimi dozami prostaglandinov pa 84 % (2). V novejši raziskavi, kjer so uporabili nekoliko drugačen protokol zdravljenja piometre izključno z uporabo aglepristona (aplicirali so ga na dan postavitve diagnoze in potem še 2., 5. in 8. dan), je bila uspešnost zdravljenja kar 100 %, bolezen pa se po 24 mesecih spremljanja ni ponovila (4).

### *Antagonisti GnRH*

V letu 2015 je bila prvič objavljena možnost uporabe antagonistov GnRH z namenom zdravljenja piometre. V raziskavi so aplicirali antagonist GnRH (Acyline, ki ga NICHHD, ZDA uporablja v raziskovalne namene za kontracepcijo), ki zmanjša kroženje GnRH v krvnem obtoku in posledično vpliva na znižanje koncentracije progesterona. Po treh dneh aplikacij so z ultrazvočno preiskavo pri psicah, ki so imele ob začetku zdravljenja visoke koncentracije progesterona, ugotovili zmanjšanje obsega rogov maternice, kar pa ni veljalo za psice z nizkimi koncentracijami progesterona. Zdravilo se je izkazalo kot izredno

uspešno pri živalih v diestrusu in je brez stranskih učinkov. Ni pa primerno za zdravljenje pri psicah, ki so piometro razvile v obdobju anestrusa (5).

## Zaključek

Piometra je resno in življenje ogrožajoče obolenje s sistemskimi učinki, ki zahteva takojšnje zdravljenje. Psice s piometro moramo ustrezno stabilizirati, lastnikom pa pojasniti možnosti konservativnega in kirurškega zdravljenja. Za konservativno zdravljenje se odločamo pri mladih psicah z visokim reprodukcijskim potencialom in brez življenjsko ogrožajočih bolezni, kot so peritonitis, septikemija, endotoksemija in odpoved notranjih organov. Zaradi novejših zdravil z manj stranskimi učinki in novimi bolj učinkovitimi protokoli pa bo morda nekoč imelo konservativno zdravljenje prednost pred kirurškim.

## Reference

1. Fransson BA. Ovaries and uterus. In: Tobias KM, Johnston SA, eds. *Veterinary Surgery: Small Animal*. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012: 1871-90.
2. Fieni F, Topie E, Gogny A. Medical treatment for pyometra in dogs. *Reprod Domest Anim* 2014; 49: 28-32.
3. Gogny A, Fieni F. Aglepristone: A review on its clinical use in animals. *Theriogenology* 2016; 85: 555-66.
4. Contri A, Gloria A, Carluccio A, Pantaleo S, Robbe D. Effectiveness of a modified administration protocol for the medical treatment of canine pyometra. *Vet Res Commun* 2015; 39: 1-5.
5. Batista PR, Blanco PG, Gobello C. Treatment of canine pyometra with the gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline: a case series. *Top Companion Anim Med* 2015; 30: 25-7.

## Pyometra in the bitches: To spay or not to spay?

Canine pyometra is an inflammatory and infectious disorder of the uterus, typically occurring in adult, intact bitches during or immediately after the luteal phase of the estrous cycle. It develops when purulent secretions accumulate in the uterine lumen of sexually intact bitches. Ovariohysterectomy is the treatment of choice, since it is both curative and preventive for recurrence of pyometra. However, surgery is associated with the risk of anaesthetic death and renders the bitch sterile. If the bitches are of appropriate breeding age, reproductively valuable and free of immediate life-threatening illness (including septicemia, endotoxemia, or organ dysfunction), medical management can be performed. The initial goal of medical management is to reduce the progesterone stimulation of the uterus, which contributes to a favorable uterine environment for bacterial infection. This goal can be achieved by administering medications that promote regression of the progesterone-producing corpora lutea or that block progesterone receptors in the uterus.

Key words: pyometra; bitch; medical treatment; surgical treatment



---

## **Ptice, mali sesalci in plazilci**

Birds, small mammals and  
reptiles



# THE EFFECT OF DIET ON HEALTH AND WELFARE OF PET RABBITS

Anna Meredith, Kevin Eatwell\*

Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, United Kingdom

kevin.eatwell@ed.ac.uk

Feeding an appropriate diet to a rabbit is probably the single most important factor in maintaining its health. There is a great deal of literature relating to the nutrient requirements of production and laboratory rabbits, but relatively little relating specifically to the pet rabbit. Pet rabbits have the potential for a much longer lifespan than the short-lived production or experimental rabbit. Many of the diseases commonly seen in pet rabbits can be directly attributed to, or associated with, the feeding of an inappropriate diet and could be largely preventable, but the effects of diet on health have been poorly studied in pet rabbits.

A two year controlled feeding trial on 32 Dutch rabbits was carried out to assess the effects on rabbit health and welfare of four diets: Hay only (fed *ad lib* Timothy hay); Nugget and hay (fed 50g/day extruded nuggets and *ad lib* Timothy hay); Muesli only (fed 125g/day muesli); and Muesli and hay (fed 60g muesli/day and *ad lib* Timothy hay). The key aims of this study were to investigate the effects of these diets on body weight and body condition score, food and water intake, faecal output, dental health and behaviour. The results provided statistically significant evidence that feeding of muesli is associated with:

- Obesity (BCS>4) and inactivity - rabbits fed muesli only spent the least time feeding and most time inactive
- Selective feeding, leading to intake of an unbalanced diet with low fibre intake. Rabbits fed muesli selectively ate the grains and extrudates, and left the stalks and fortified pellets
- Reduced water intake
- Smaller droppings and low faecal output, indicating reduced gastrointestinal motility
- Uneaten caecotrophs
- Dental disease - increased tooth length and curvature (PM1) and widening of interdental space between M1-M2 in both groups fed muesli, indicating early dental pathology. 37.5% rabbits in muesli-only group developed clinical dental disease and had to be removed from the study.

Feeding of muesli-type diets to pet rabbits cannot therefore be recommended due to its detrimental effect on health.

**Ekonomске živali**

Farm animals

---

**Prežvekovalci**

Ruminants

# Cyclopray®

78,6 mg/g

dermalno pršilo, suspenzija  
za prašiče, ovce in govedo



- Dokazana klinična učinkovitost
- Hitro se suši
- Varen za uporabnika, živali in okolico
- Ni karence za mleko in meso

# DETERMINATION OF BLOOD VARIABLES TRESHOLDS IN PREDICTION OF PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCES IN DAIRY COWS: USE OF RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC) ANALYSIS

Danijela Kirovski

Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Serbia

dani@vet.bg.ac.rs

Decreased milk production and impaired reproductive performances of dairy cows provoke huge economic losses in dairy farm industry. Those disturbances are mostly a consequence of productive diseases (PD) that occurred, commonly, during peripartal period, defined as period from 21 days before until 21 days after calving. The factors that predispose cows to PD mainly include low feed intake combined with increased energy demand and/or endocrine disturbances that disable adequate adaptation of cows to increased milk production. Those factors are manifested during early postpartal period but originated from disturbances that occur during antepartal and/or puerperal period. Therefore prediction of PD could be obtained during periods when there is no visible signs of upcoming diseases. Implementing a model of the PD prediction could be a key factor that ensure profitable dairy farming.

Concentrations of different blood variables during peripartal period might be a key factors that determine the success in metabolic adaptation to increased milk production. Several studies have determined blood variable thresholds, using receiver operating characteristic (ROC) analysis as a statistical tool, for predicting different PD in transition dairy cattle. Optimal thresholds of metabolic indicators of hepatic lipidosis, ketosis and abomasal displacement were suggested by different authors. Our research team, including researchers from Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade and Veterinary Faculty University of Ljubljana, preliminary established optimal thresholds of blood variables that were associated with an increased lipid and decreased glycogen contents in postpartum liver of dairy cows. Those results were obtained as a part of bilateral research project supported by Serbia and Slovenia.

Nevertheless, there are only few studies that examined thresholds of blood variable concentrations for predicting productive and reproductive performances in dairy cows using ROC analysis. Since this statistical approach demand definition of beneficial (positive) and non-beneficial (negative) outcomes, we have introduce beneficial and non-beneficial productive and reproductive outcomes in Holstein cows on commercial dairy farms in Serbia. Considering genetic potentials of Holstain cows, we have established daily milk production higher than 30 L during early lactation and calving-conception interval shorter than 120 days as profitable for dairy cow industry in Serbia. In our study, blood samples were collected from the jugular vein at day 14 before (antepartum) and day 7 after calving (puerperium). Concentrations of glucose, BHBA, total protein, albumin, total bilirubin, urea, Ca and P were determined in blood serum. Body condition scores were also determined. Our results showed that antepartum, body condition score > 3.87, glucose > 3.45 mmol/l, BHBA > 0.65 mmol/l, total protein < 71.25 g/l and albumin < 36.75 g/l were associated with decreased milk

production, while there was no reliable blood variable for prediction of calving-conception interval. During puerperium, glucose > 2.85 mmol/l, BHBA concentration > 1.35 mmol/l and Ca < 2.05 mmol/l were associated with decreased milk production and glucose < 2,75 mmol/l was associated with longer calving-conception interval.

In conclusion, ROC analyses may be useful statistic tool for prediction of cow`s productive and reproductive performances on dairy farms.

Key words: dairy cows; milk yield; calving-conception intervals; ROC analyses

# PRISTOPI K OBVLADOVANJU OBPORODNE HIPOKALCIEMIJE PRI GOVEDU

Jože Starič

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

joze.staric@vf.uni-lj.si

Hipokalcemija je pogosto obolenje krav molznic, ki lahko poteka subklinično ali v obliki življenjsko nevarne obporodne ohromelosti (pareze). Posledica subklinične hipokalcemije je izrazito povečana verjetnost nastanka številnih poporodnih obolenj pri kravah molznicah. Rezultat je slabša plodnost, nižja prireja mleka in večja verjetnost izločitve krav, ki imajo hipokalcemijo. Zaradi tega je zelo pomembno, da razumemo vlogo hipokalcemije pri nastanku bolezni in poznamo načine, kako jo ugotoviti in preprečevati na nivoju črede. V prispevku so predstavljeni dejavniki, ki povečajo verjetnost nastanka obporodne hipokalcemije in načini za obvladovanje stanja.

Ključne besede: kalcij; krave molznice; preventiva; pareza; čredno zdravje

## Uvod

Povprečna mlečnost kontroliranih krav molznic se je po podatkih Kmetijskega inštituta Slovenije iz leta 2015 v zadnjih dvajsetih letih povečala za 2000 kg v standardni laktaciji, kar je skoraj 50 % večja prireja mleka po kravi. Oskrba krav pogosto ne dosega tako izrazitega izboljšanja. Takšne razmere močno povečajo presnovni stres krav molznic predvsem na prehodu iz presušitve v laktacijo. Bistvena za zmanjševanje presnovnega stresa ter preprečevanje vseh presnovnih obolenj v obporodnem obdobju je ustrezna oskrba in priprava krave na telitev in laktacijo. Glavna obolenja krav molznic v ožjem poporodnem obdobju so najpogosteje posledica neustreznega krmnega obroka in nepravilnosti pri pripravi ter načinu pokladanja krme, kar ima za posledico nezadostno zaužitje krme v obporodnem obdobju. Rezultat tega je primanjkljaj hranilnih snovi potrebnih za produkcijo in hujšanje živali. Za presnovna obolenja je značilno, da vplivajo na nastanek drug drugega in zato pogosto nastopajo hkrati.

Hipokalcemija v obporodnem obdobju je stanje pomanjkanja Ca v krvi, ki je najpogosteje posledica neustrezne priprave krave na telitev. Visoko produktivna krava molznica je izredno zelo obremenjena, ker mora zagotoviti z zagotavljanjem zadostne količine Ca v krvi, saj s kolostrumom in mlekom izgublja zelo velike količine Ca. Za ilustracijo vzemimo 600 kg kravo molznico, ki ima v celotni krvni plazmi, pri koncentraciji skupnega Ca 2,4 mmol/L, okoli 3 g čistega Ca. Vsak liter njenega kolostruma vsebuje okoli 2 g Ca in mleka več kot 1 g (1). Ob prireji 8 litrov kolostruma izgubi vsaj 16 g Ca in pri dnevni prireji mleka 20 L, 20 g Ca, pri prireji 50 L mleka na dan pa kar 50 g Ca na dan, kar pomeni, da mora v enem dnevu več kot 16x popolnoma nadomestiti svoj Ca v krvi. Če ji to ne uspe, nastopi subklinična hipokalcemija ali pa klinično vidna in življenjsko nevarna hipokalcemija oz. obporodna ohromelost (pareza). Za hipokalcemijo pri kravah molznicah velja učinek »ledene gore«, kar pomeni, če opazimo klinične primere bolezni, imamo sigurno prisotnih še dosti več

subkliničnih primerov, ki imajo prav tako zelo škodljiv učinek na puerperij in povečujejo pojavnost drugih bolezni v čredi. Znale in dokazane so povezave med hipoklacemijo in oteženim porodom, izpadom maternice, zaostalim trebilom, materničnimi infekcijami po telitvi, upočasnjeno involucijo maternice, manjšimi ovulacijskimi folikli, timpanijo ter atonijo vampa, dislokacijo siriščnika, negativno energetska bilanco in mastitisom (2). Povprečni stroški hipokalcemične obporodne preze, ki upoštevajo vse dejavnike, vključno z bolj zgodno izločitvijo krav in večjo verjetnostjo drugih bolezni so ocenjeni kar na 300 evrov (3). Zaradi vsega navedenega je bistveno preprečevanje hipokalcemije in njeno čim zgodnejše odkrivanje v čredi z namenom hitrega ukrepanja, da se zmanjša škoda. Namen prispevka je predstaviti možnosti za preprečevanje hipokalcemije pri kravah molznicah in možnosti za njeno čim učinkovitejše odkrivanje.

## Fiziologija homeostaze Ca

Ker je Ca nujno potreben za delovanje organizma, je njegova koncentracija v krvi natančno regulirana s hormoni. Ključno vlogo pri regulaciji koncentracije Ca v krvi ima občitnica, ki je izredno občutljiva na znižanje ioniziranega Ca v krvi. Ob hipokalcemiji začne intenzivno izločati občitnični hormon (PTH), ki deluje primarno na osteoblaste in osteocite ter celice ledvičnih tubulov (4).

Osteoblasti se odzovejo na stimulacijo s PTH z izločanjem nekaterih citokinov, katerih funkcija je aktivacija osteoklastov, da se začnejo replicirati in resorbirati kostnino. Proces resorpcije kostnine z osteoklasti imenujemo tudi osteoklastna osteoliza. Sistem osteoklastne osteolize se vzpostavi do pomembne mere šele v nekaj dneh.

Za razliko od učinka na osteoblaste pa ima učinek PTH na osteocite izredno hiter odziv. Literatura navaja, da se ob stimulaciji osteocitov začne Ca prenašati iz kostne tekočine, ki je v lakunah okoli osteocitov že v nekaj minutah. Količina Ca v kostni tekočini lakun je od 9 do 15 g. Proces prenosa Ca s pomočjo osteocitov iz tekočine lakun imenujemo osteocitna osteoliza (1).

V ledvicah PTH stimulira resorpcijo Ca v proksimalnih tubulih in sintezo aktivne oblike vitamina D (kalcitriola). Slednji povzroči, da se aktivirajo mehanizmi za aktivno resorpcijo Ca v črevesju, in sicer Ca kanački na apikalni membrani enterocitov, Ca vezoča beljakovina v citosolu enterocitov, ki transportira Ca na bazolateralno membrano, kjer je še tretja beljakovina, ki nastaja pod vplivom vitamina D hormona, Ca-ATPazna črpalka. Njena naloga je, da črpa Ca iz citosola enterocitov v krvni obtok. Za vzpostavitev sistema aktivne resorpcije Ca iz črevesa do stopnje, ki ima pomemben učinek na vzpostavitev normokalcemije je potrebnih po podatkih iz literatura vsaj 48 ur (1). Ca se lahko v črevesju resorbira tudi pasivno, v smeri koncentracijskega gradienta, paracelularno med enterociti. Ta mehanizem resorpcije Ca je pomemben predvsem v času zadostne oskrbe.

## Načini obvladovanje obporodne hipokalcemije

Presežek kalija (K) v obroku in metabolična alkalozia pri kravah pred telitvijo močno povečuje verjetnost nastanka hipokalcemije. Mehanizem, ki je odgovoren za to je slabša odzivnost tkiv na občitnični hormon (PTH) pri kravah, ki so obilno oskrbljene s K. Višji pH tkiv spremeni konformacijo receptorja za PTH, kar preprečuje vezavo PTH nanj v ciljnih tkivih. Posledica tega je, da kljub hormonskemu odzivu na znižano koncentracijo Ca v krvi ne pride do zadostne resorpcije Ca iz kanalikulov kosti, osteoklastične aktivnosti, resorpcija

Ca v ledvicah in nastajanja kalcitriola (1). Pri kravah s trdovratno hipoklacemijo so vedno izmerili zadostno količino PTH v krvi, vendar pa je bil odziv tarčnih tkiv na stimulacijo z njim nezadosten. Tudi dajanje PTH stanja ni spremenilo, kar je ovrglo starejše hipoteze, ki so predvidevale, da je pri hipokalcemičnih kravah moteno izločanje PTH.

Vsebnost K v suhi snovi obroka mora biti čim bližje 1 %, da ne pride do omenjenih negativnih učinkov in posledično do hipokalcemije. Kadar tega ne moremo doseči si lahko pomagamo z dajanjem anionskih soli v obrok, s katerimi spodbujamo nastanek metabolične acidoze. Najučinkovitejše anionske soli temeljijo na vnašanju dodatnega klora (glavni anion) v obrok. Velja pravilo, da mora biti količina klora v obroku za 0,5 % nižja od deleža K v obroku. Na primer, če krmni obrok vsebuje 1,2 % K moramo klor v krmnem obroku spraviti na 0,7 % s pomočjo anionskih soli na osnovi klora (1). Dajemo jih največkrat zadnje tri tedne pred predvideno telitvijo, po telitvi pa takoj prenehamo z njihovim dajanjem, ker so v tem obdobju zelo škodljive za krave. Teoretično bi lahko anionske soli dodajali v obrok le zadnji teden pred predvideno telitvijo, če bi jo lahko natančno napovedali, kar popolnoma zadostuje za doseg namena zakislitve obroka in spremenjeno presnovo kalcija. Ciljna vrednost kationsko anionske razlike obroka po dajanju anionskih soli je od 0 do -100 mEq/kg suhe snovi. Stopnjo metabolične acidoze živali lahko spremljamo z mejenjem pH urina, katerega ciljna pH vrednost pri črno belih kravah mora biti med 6,2 in 6,8. Vsako zmanjšanje kationsko anionske razlike obroka zmanjša verjetnost hipokalcemije, ker velja med njima linearna odvisnost (1).

Pomanjkanje magnezija (Mg) povzroča manjše izločanje PTH pri odzivu na hipokalcemijo in dodatno še slabši odziv tkiv na PTH. Mg mora biti 0,35 do 0,40 % v suhi snovi obroka, da preprečimo ta učinek. Ali so krave dovolj oskrbljene z Mg lahko preverimo z merjenjem koncentracije Mg v krvnem serumu ali plazmi, kjer mora biti v koncentraciji vsaj 0,8 mmol/L. Raziskave so pokazale, da že blaga hipomagneziemija povečuje verjetnost nastanka hipokalcemije v obporodnem obdobju (1).

Omejiti je potrebno količino zaužitega fosforja (P) pri visoko brejih kravah. Hiperfosfatemija namreč zmanjšuje aktivnost 1 $\alpha$  hidroksilaze, ki pretvarja 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> v kalcitriol. Visoko breje krave naj imajo 0,3 % ali manj P v suhi snovi obroka. Razmerje med Ca in P v obroku, v razponu od 1 pa do 7:1 naj nebi imelo negativnega učinka na metabolizem Ca (1).

Dajanje visokih odmerkov (10 milijonov I.E.) vitamina D<sub>3</sub> 2 do 8 dni pred predvideno telitvijo zmanjšuje verjetnost obporodnih obolenj in pareze po telitvi (4). Problematično pri tem načinu preventive je, da je nemogoče določiti točen dan telitve in je pogosto potrebno večkratno dajanje vitamina D<sub>3</sub>. Po nekaterih podatkih lahko večkratno dajanje tako visokega odmerka povzroča poapnitev mehkih tkiv.

Razen omenjenih obstajajo še uveljavljene metode preventive, kot so nepopolna molža krav nekaj dni po telitvi, pokladanje obroka z zelo nizko vsebnostjo Ca pred telitvijo in dajanje Ca pripravkov za per os uporabo ali parenteralno uporabo takoj po telitvi. Vse omenjene metode imajo pozitivne učinke, vendar pa tudi zadržke, npr. večjo verjetnost nastanka mastitisa, težko pripravo obroka z zadosti nizko koncentracijo Ca in dodatno delo, kadar dajemo Ca per os.

## Diagnostika hipokalcemije v čredi

Smatramo, da je krava hipokalcemična, če ima vsebnost Ca v krvi pod 2,0 mmol/L in sicer v času od 12 do 24 ur po telitvi. Realističen cilj rejcev mora biti, da ima manj kot 5 % krav obporodno parezo in manj kot 30 % subklinično hipokalcemijo. Ob upoštevanju meje za ukrepanje pri 30 % hipokalcemičnih krav v čredi in ob 75 % sigurnosti lahko izvedemo testiranje pri 12 kravah, 12 do 24 ur po telitvi, tako da jim vzamemo vzorce krvi



in v njih izmerimo vsebnost celokupnega Ca. Če je od teh krav 6 ali več hipokalcemičnih je to znamenje, da je hipokalcemija problem v reji in bi bilo smiselno ukrepati (5). Ob tem naj poudarim, da je pravilna obdelava in shranjevanje krvnih vzorcev bistveno za kakovosten rezultat meritev v laboratoriju.

## Razprava

Hipokalcemija krav molznic predstavlja področje zdravstvenega varstva, ki se mu ne namenja dovolj pozornosti, kljub temu da ima bistven vpliv na zdravstveno in produkcijsko dogajanje v obporodnem obdobju ter tudi kasneje v laktaciji. Povezana je z velikimi izgubami, ki jih pogosto pripisujemo drugim vzrokom. Hipokalcemija ni le obporodna pareza, ampak je stanje, katerega posledice so številne zdravstvene težave krav molznic. Preprečevanje hipokalcemije mora postati eden od ključnih ciljev vsakega rejca in veterinarja ne glede na način reje krav molznic ter možnosti glede oskrbe in upravljanja črede.

## Reference

1. Goff JP. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J* 2008; 176(1): 50-7.
2. Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ et al. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J Am Vet Assoc* 1983; 183(5): 559-66.
3. Kossaibati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J* 1997; 154: 41-51.
4. Starič J. Dinamika biokemijskih kazalcev metabolizma kosti krav molznic, tretiranih z visokim odmerkom vitamina D<sub>3</sub>, kot preventiva obporodne hipokalcemije, doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2010: 148.
5. Oetzel GR. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004; 20(3): 651-74.

## Tackling periparturient hypocalcaemia in cattle

Hypocalcemia is a clinical condition of in dairy cows that is often subclinical or can be in the form of life-threatening periparturient paresis (milk fever). Subclinical hypocalcemia results in markedly increased likelihood of many periparturient diseases in dairy cows. Inferior fertility, lower milk production and a higher probability of culling are often results of increased hypocalcaemia incidence in a herd. For this reason, it is very important to understand the role of hypocalcemia in the genesis of the common periparturient diseases and the ways how to identify and prevent it on a herd level. The aim of this paper is to discuss factors that cause hypocalcemia and introduce strategies to prevent it.

Key words: calcium; dairy cows; prevention; milk fever; herd health

# PRIMER POLYMELIE PRI TELICI KRIŽANKI S CIKASTIM GOVEDOM

Jana Brankovič<sup>1\*</sup>, Marko Cotman<sup>1</sup>, Jernej Šmigoc<sup>2</sup>, Jožica Ježek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, <sup>2</sup>živinozdravniška ambulanta KRI & ZA d.o.o., Cirkovce, <sup>3</sup>Klinika za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jana.brankovic@vf.uni-lj.si

Polymelia ali nadštevilna ektopična okončina (SEL) je prirojena motnja mišičnoskeletnega sistema, ki se pri živalih lahko pojavi na različnih telesnih področjih. Navadno gre za posamične motnje, redkeje kombinirane z drugimi razvojnimi ali podedovanimi anomalijami. Telica, križanka s cikastim govedom, je imela atrezijo anusa in poleg normalno razvitih dveh prsnih in dveh medeničnih okončin tudi SEL na področju presredka. Izvedla se je kirurška rekonstrukcija anusa in ekscizija SEL, na kateri smo opravili patoanatomsko in genetsko preiskavo (primerjava mikrosatelitskih profilov). Dodatna okončina je bila nepopolnoma razvita, deformirana vstran na področju stopala in nefunkcionalna. Kolčnica, stegenica in golenji kosti so bile izrazito zreducirane, medtem ko so bile kosti stopala precej dobro razvite. Okolico kolčnice je zapolnjevalo maščobno tkivo, mišičnega tkiva in živcev nismo našli. Primerjava med mikrosatelitskimi profili je pokazala popolno ujemanje med aleli in zelo verjetno je ektopična okončina pripadala telici. Pojav polymelie in atrezije anusa pri isti živali nakazuje dedovanje mutiranih genov. Operacija atrezije anusa je živali omogočila normalno življenje, uspešna odstranitev dodatne okončine pa izboljšala njeno počutje in izgled živali. Ta študija primera prvič opisuje polymelio pri teletu v Sloveniji.

Ključne besede: tele; malformacija; atrezija anusa; polymelia; cikasto govedo

## Uvod

Pri razvojnih defektih pri govedu najdemo kar v 24% prirojene motnje mišičnoskeletnega sistema. Mednje sodi tudi polymelia ali nadštevilna ektopična okončina (SEL), kjer se pri osebkah razvije več okončin kot navadno. Največkrat gre za eno dodatno okončino, redko dve ali več, ki so lahko pritrjene na različnih telesnih področjih. V primeru dodatne okončine na področju medenice to natančneje imenujemo pygomelia ali dipygus. V literaturi poročajo o 2 do 3,5% incidenci SEL pri porodih telet, jagnjet in kozličkov; večinoma gre za posamične motnje, redkeje kombinirane z drugimi razvojnimi ali podedovanimi anomalijami (1). Dodatna okončina je večinoma slabše razvita, deformirana in nefunkcionalna. Včasih se lahko eden od zarodkov začne razvijati kot himera, ki degenerira do te mere, da ostane od njega samo ena ali več okončin pripetih na drug (razvit) zarodek. Prirojene motnje lahko povzročajo genetski dejavniki (mutacije na genih vključenih v fosforilacijske poti, kromosomske napake), zunanji dejavniki (infekcije, toksini, teratogene kemikalije, radioaktivnost, tehnike osemenjevanja, metabolno neravnovesje) ali kombinacija več dejavnikov (2). Pri atreziji anusa gre za ohranitev tanke opne, ki ob rojstvu prekriva analni kanal in zapira lumen črevesja ter s tem onemogoča defekacijo. Ta študija primera prvič opisuje pojav polymelie pri telici križani s cikastim govedom v Sloveniji.

## Material in metode

### *Anamneza*

Telica je bila namenjena pitanju v reji s povprečno 25-30 glav pretežno cikastega goveda v občini Videm na južnem robu Dravskega polja, kjer v reji govedo krmijo z izključno doma pridelano krmo. Pozimi so živali v hlevu in krmljene s senom in travno silažo, sicer se živali prosto pasejo in imajo na voljo suho seno. Vitaminski dodatki v obliki lizalnih kamnov so vedno na voljo. Pri teletu je šlo za umetno osemenitev.

### *Splošni klinični pregled*

Veterinar je aprila 2014 ob kliničnem pregledu novorojene telice, križanke med lisastim in cikastim govedom (LS/CK)CK opazil atrezijo anusa in dodatno izraslo okončino zadaj v bližini repa. Telica se je napenjala zaradi onemogočene defekacije, vendar je bila živahna, odzivna, z rahlo povišano frekvenco pulza, temperaturo 38,6 °C in normalno frekvenco dihanja. Pri avskultaciji pljuč in srca ni bilo zaznati nenormalnosti. Popek je bil brez posebnosti. Anus je bil popolnoma zaprt (popolna atrezija, *leva slika*). Strukture in odprtine sečno-spolnega aparata (preddvor nožnice, zunanje ustje sečnice; podsečnični mošnjček, sramnica z ustnicami, presredek in ščegetavček) so bile normalno razvite in žival je urinirala brez posebnosti. Telica je imela normalno razviti dve prsni in dve medenični okončini, poleg pa še dodatno slabo razvito in močno okrnjeno okončnino, ki je bila na trup pritrjena brez sklepne povezave na področju presredka (*regio perinealis*), lateralno od vulve na desni strani (*leva slika*). Gibljivost sklepov dodatne okončine je bila močno omejena, motorične kontrole in občutljivosti na dotik v temu delu ni bilo.

### *Operativni poseg*

Pri telici stari tri dni se je v splošni in lokalni anesteziji izvedla kirurška rekonstrukcija anusa (odstranitev opne) in s kirurško ekcizijo odstranila dodatna okončina (*desna slika*). Pred njeno popolno odstranitvijo je bilo potrebno podvezati žilo, ki je prehajala na to okončnino, domnevno eno od perinealnih vej *a. pudende interne*.

### *Patoanatomska in genetska preiskava*

Po kirurški odstranitvi smo SEL izmerili, odstranili kožo, podkožno tkivo in druge strukture ter termično obdelali kosti.

Vzorci DNA smo izolirali iz tkiva SEL in iz krvi telice s kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Iz vzorcev DNA smo s PCR pomnožili mikrosatelite z uporabo kita Finzymes Bovine Genotypes Panel 1.2 (Finzymes). Ločevanje pridobljenih fluorescentno označenih produktov PCR smo opravili z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Rezultate kapilarne elektroforeze smo analizirali s programom GeneMapper® v3.7.

## Rezultati

Telico smo spremljali šest mesecev po kirurškem posegu, v tem času ni imela pooperativnih komplikacij. Kirurške rane so se normalno zacelile in vzpostavila se je normalna defekacija. Telica je normalno priraščala.

### *Patoanatomska preiskava*

je pokazala, da je bila dodatna okončina nepopolno razvita, dolžine približno 40 cm ter enakomerno poraščena z dlako, stopalo se je končalo z dvema parkljema. Okončina je bila tanka in deformirano ukrivljena vstran na področju stopala. Glede na obliko prepoznanih kosti, ki naj bi ustrezale kolčnici in zadnjim stopalnicam (tj. zadnji kračnici) ter na podlagi oblikovanosti sklepnih ploskev za nartnice na bazi kračnice sklepamo, da je šlo za dodatno zadnjo desno okončino. Področje kolčnice, stegna in goleni je bilo zelo zreducirano in slabo razvito (na nekaterih delih so bile kosti neprepoznave), medtem ko je bila večina kosti stopala (stopalnice, predvsem pa prstnice) precej dobro razvita. Področje kolčnice je bilo zapolnjeno s precejšnjo količino maščobnega tkiva, med maščobo pa smo našli votlino velikosti približno 5 x 3 cm, ki je bila zmerno napolnjena z redko in bistro rdečkasto tekočino. Mišično tkivo na dodatni okončini ni bilo razvito. Živcev na okončini nismo našli, okončnino je s trupom povezovala tudi večja žila, ki se je končala v maščobi na področju kolčnice. Druga večja žila se je začela v področju nad skočnim sklepom in je potekala po dorzalni strani stopala (v *sulcusu longitudinalis dorsalis* kračnice) do parkljev, kjer se je razcepila na dva kraka, ki sta potekala do obeh distalnih prstnic - parkeljnic (*os ungulare*). Kolčnica je bila popolnoma zraščena kost, dolga 12,4 cm in slabo razvita, vendar še vedno oblikovana tako, da se je dalo določiti kranialni in kaudalni konec kosti. Nanjo se je prislanjala kost v obliki polovične krogle, ki bi lahko ustrezala stegnenični glavi. Stegnenica je bila oblikovno in funkcionalno nerazvita, domnevno sta jo sestavljali dve ločeni kosti nepravilnih ovalnih oblik (polovična krogla, na katero se je prislanjala kost nepravilne piramidalne oblike). Nanjo se je prislanjala manjša trikotna koščica dolžine 4 cm, ki bi lahko ustrezala golenici. Stika oz. sklepne povezave med golenjo kostjo in nartnicami ni bilo (neomejeno premikanje). Stopalo je bilo (v primerjavi s stebrom okončine) bolje razvito. Dokaj razvite nartnice v treh vrstah so bile med sabo koščeno zraščene, a se je dalo razbrati levo petnico in delno razvito skočnico. Distalna vrsta nartnic (*os tarsale I in II+III*) je po vsej verjetnosti manjkala, saj se je na zraščeno kost nartnic pod kotom s sklepom pripravala kračnica. Kračnica je bila najbolj razvita kost dodatne okončine (podobna dvojni cevi, na prečnem prerezu nakazna kvadratasto obliko). Sklepna ploskev na bazi kračnice je bila oblikovana pod kotom, da se je prilegala nartnicam. Longitudinalna žlebova na dorzalni in plantarni strani sta bila nakazana. Na distalnem okrajku so bile sklepne ploskve za proksimalno prstnico nepopolno razvite, predvsem medialni sklepni valj, saj sklepna ploskev in sagitalni greben na njej sploh nista bila izražena. Druge stopalnice ni bilo razvite. Prstnice so bile precej dobro razvite (predvsem za četrti prst), vendar je bil dlančnično-prstnični sklep precej ukrivljenim proti medialni strani.

### *Genetska preiskava*

Primerjava alelov posameznih mikrosatelitov iz DNA, izolirane iz SEL, in DNA, izolirane iz krvi telice, je pokazala ujemanje vseh alelov posameznih mikrosatelitov. Na elektroferogramu ni bilo opaziti dodatnih vrhov, ki bi lahko nakazovali možnost mozaicizma.

## Razprava

V tej reji je bil to prvi primer prirojene mišičnoskeletne motnje, zato pojav dveh različnih prirojelih motenj pri teletu križancu s cikastim govedom (pygomelia in atrezija anusa) kaže bolj na dedovanje mutiranih genov kot zunanjih vplivov okolja med osemenitvijo in



Slika: Telica takoj po kotitvi z atrezijo anusa in dodatno ektopično okončino (levo) in telica dva tedna po kirurški odstranitvi dodatne okončine (desno)

brejostjo. Vzrok za polymelio pri sesalcih so lahko kromosomske napake ali mutacije na genih. Mutacije so pri enem ali več genih vključenih v fosforilacijske poti. Te poti regulirajo ubikvitinacijo in posledično razgradnjo proteinov, ki kontrolirajo prehod proteinov, odgovornih za aktivacijo transkripcije genov vključenih v celični cikel in apoptozo, v jedro. Omenjene mutacije na genih in kromosomske napake so lahko tudi posledica zunanjih teratogenov. Primer polymelie pri telici črno bele pasme so opisali Hirsbrunner in sod. (3), vendar je šlo pri njihovem primeru za dodatno sprednjo okončino in telica ni imela drugih malformacij. Po podatkih švicarskih rejских združenj črno belega, lisastega in rjavega goveda se polymelia pojavlja izjemno redko (incidenca pod 0,004%) (3). Dodatna ektopična okončina se je pri naši telici izkazala za zadnjo desno nogo, pritrjeno na trup brez sklepne povezave. Proksimalni del okončine do skočnega sklepa je bil izrazito zreduciran, medtem ko je bilo stopalo dobro ohranjeno, le ukrivljeno v medialno smer. Primerjava profila mikrosatelitov je pokazala popolno identičnost med aleli DNA izolirane iz SEL in krvi telice, kar kaže, da ektopična okončina zelo verjetno pripada telici, vendar pa ne moremo izključiti himere enojajčnega dvojčka. Glede na pretekla poročanja bi dodatna okončina z rastjo lahko povzročala težave pri lokomociji živali (4). Veliko prirojelih motenj pri prežvekovalcih se lahko uspešno sanira s kirurškimi posegi, kar vodi v boljše počutje in videz živali (4).

Starič in Zadnik sta v Sloveniji opisala en primer atrezije anusa in pet primerov atrezije kolona pri moških teletih črno bele pasme (5). V našem primeru je operacija anusa telici omogočila normalno iztrebljanje in s tem preživetje, poleg tega pa je uspešna operativna odstranitev SEL, kljub težavni lokaciji v bližini zunanjih spolovil, preprečila morebitne poškodbe ter živali omogočila nemoteno nadaljnje življenje.

## Reference

1. Villagomez DA, Alonso RA. A distinct Mendelian autosomal recessive syndrome involving the association of anotia, palate agenesis, bifid tongue, and polydactyly in the dog. *Can Vet J* 1998; 39: 642-3.
2. Newman SJ, Bailey TL, Jones JC, Digrassie WA, Whittier WD. Multiple congenital anomalies in a calf. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 368-71.
3. Hirsbrunner G, Keller C, Dolf G. Polymelie bei einem Holstein Friesian Kalb. *Schweizer Archiv Tierheilkunde* 2002; 144: 289-91.
4. Hussein KE, Ali MM, Galal AF. Successful surgical treatment of a supernumerary ectopic limb in a cattle calf. *Eur J Vet Med* 2012; 1: 28-35.
5. Starič J, Zadnik T. Atrezije črevesa pri teletih. Klinični primeri atrezij črevesa na Kliniki za prežvekovalce v Ljubljani. *Veterinarske novice* 2001; 27: 385-94.

## Case report: Polymelia in a newborn calf crossbreed with Cika cattle

Polymelia or supernumerary ectopic limb (SEL) is a congenital anomaly of musculoskeletal system that can be found at different animal body regions. This malformation usually occurs solitarily or rarely together with other developmental/ inheritable anomalies. In the case of a newborn female calf (crossbred with Cika cattle) anal atresia together with SEL attached to the perineal region was observed. We performed surgical reconstruction of the anal canal and the SEL removal following pathoanatomical diagnosis and genetic test (microsatellite profiles). The SEL was underdeveloped, partly deformed and not functional. The hip bone, *femur*, *tibia* and *fibula* were extremely reduced while the tarsals, metatarsals and phalanges were developed almost normally. Around the hip bone a large amount of fat tissue was present while the limb was devoid of muscular tissue. Comparisons between microsatellite profiles showed complete similarity of alleles therefore the SEL most likely belongs to the calf. The coincidence of polymelia and anal atresia in the same animal points out the inheritance of abnormal genes. The operation of anal atresia enabled the animal normal life and the successful removal of the SEL improved her wellbeing and appearance. The present paper is the first report of polymelia in a cattle calf in Slovenia.

Key words: calf; congenital anomaly; anal atresia; polymelia; cika cattle

# PARAZITOSE PRI DROBNICI

Jožica Ježek\*, Polona Kodermac, Janja Tušar, Aleksandra Vergles Rataj

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jozica.jezek@vf.uni-lj.si

Parazitoze pri drobnici predstavljajo velik problem, ki se kaže kot slabše zdravstveno stanje živali in povzroča rejcem gospodarsko škodo. V prispevku bomo predstavili preliminarne rezultate Prešernove raziskovalne naloge s katero smo želeli pridobiti podatke o prisotnosti parazitov oz. njihovih jajčec in razvojnih oblik (L1 ličink) pljučnih črvov ter o načinih njihovega zatiranja v tropih drobnice po Sloveniji. Podatke o rejah in načinu zatiranja parazitov smo pridobili s pomočjo vprašalnikov, za ugotavljanje prisotnosti parazitov v tropih pa smo izvajali koprološke preiskave (sedimentacija, flotacija, metoda po Vajdi in po McMastru). Na spletne vprašalnike je odgovorilo 133 rejcev. S koprološkimi preiskavami smo preiskali 409 vzorcev iztrebkov pred zdravljenjem in 214 vzorcev po zdravljenju z antihelmintiki. Najpogosteje smo ugotovili pred zdravljenjem prisotnost jajčec *Strongylida*, v 90,22% ter oocist *Eimeria* v 85,33% vzorcev. V Sloveniji je bilo prvič na tak način sistematično pregledanih večje število rej ovc in koz. Z opravljenim delom smo dobili podatke o rejah, prisotnosti parazitov, njihovi raznovrstnosti in načinu zatiranja.

Ključne besede: mali prežvekovalci; notranji zajedavci; koprološka preiskava

## Uvod

Parazitoze pri drobnici predstavljajo pomemben zdravstveni problem, ki povzroča rejcem gospodarsko škodo in negativno vpliva na dobro počutje živali. Paraziti črpajo hrano gostitelju, uničujejo tkivo, motijo pretok iztrebkov skozi črevo, negativno delujejo na imunski sistem in lahko prenašajo druge bolezni. Posledice, ki jih vidimo, so slabše priraščanje, zmanjšan apetit, hujšanje, driska, kašelj, motnje v reprodukciji, zmanjšana mlečnost itd. (1). Nadzor nad paraziti v tropih drobnice izvajamo z uporabo antiparazitikov. Poleg uporabe teh lahko nadzor nad paraziti izvajamo tudi z drugimi ukrepi kot so; izbira ustreznega časa zdravljenja, menjavanje pašnikov, menjavanje različnih živalskih vrst na pašnikih ali različnih starostnih skupin, menjava paše in košnje. V študiji, ki so jo izvedli na Norveškem so ugotovili, da se rejci za zdravljenje z antiparazitiki večinoma ne odločajo na osnovi pojava kliničnih znamenj (driska, hujšanje) ali rezultatov koprološke preiskave ampak zdravijo predvsem v skladu z nekimi ustaljenimi praksami, ki so se v preteklosti izkazale za uporabne (2).

V prispevku bomo predstavili preliminarne rezultate Prešernove raziskovalne naloge s katero smo želeli raziskati prisotnost parazitov in pridobiti podatke o načinih zatiranja parazitov v tropih ovc in koz v Sloveniji.

## Material in metode

Raziskava je potekala od oktobra 2015 do maja 2016. Izdelali smo spletne vprašalnike in povabili k sodelovanju rejce drobnice po celotni Sloveniji. Anketa je bila dostopna na

spletnem portalu [drobnica.si](http://drobnica.si). in je vsebovala vprašanja, ki so se nanašala na način reje, zatiranje parazitov in biovarnost.

Rejci, ki so sodelovali v raziskavi so lahko poslali vzorce iztrebkov svojih živali na koprološko preiskavo. Poslali so od 3 do 12 vzorcev, odvisno od števila živali v tropu. Vzorce smo pregledovali pred zdravljenjem ter ponovno 7 do 14 dni po zdravljenju. Pred pričetkom koproloških preiskav smo vzorce individualno označili. Izvajali smo sedimentacijo, flotacijo, metodo po McMastru in Vajdi. S pomočjo programa MS Excel in SPSS (Ver. 22) smo izračunali mediano in 1. ter 3. kvartil za število jajčec in oocist ugotovljenih pri koproloških preiskavah ter delež pozitivnih vzorcev.

## Rezultati

Analizirali smo 623 vzorcev iztrebkov ovc in koz iz celotne Slovenije.

Tabela 1: Število jajčec (EPG) oz. oocist (OPG) parazitov v vzorcih iztrebkov (n=409) pred zdravljenjem

Parazit	Mediana	1. in 3. kvartil	Min. in max. število	Pozitivni vzorci (%)
<i>Eimeria</i> spp.	350	150, 1050	50, 177600	85,33
Strongylida	400	150, 900	50, 12650	90,22
<i>Strongyloides papillosus</i>	75	50, 150	50, 1300	10,27
<i>Nematodirus</i> spp.	50	50, 100	50, 200	14,18
<i>Moniezia</i> spp.	100	50, 200	50, 450	9,54

Tabela 2: Prisotnost jajčec ostalih parazitov v vzorcih iztrebkov (n=409) pred zdravljenjem

Parazit	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	<i>Trichuris</i> spp.	Protostrongylidae	<i>Capillaria</i> spp.	<i>Skrjabinema</i> spp.	<i>Paramphistomum</i> spp.
Pozitivni vzorci (%)	24,94	18,34	32,76	2,20	0,49	0,24

Tabela 3: Število jajčec (EPG) oz. oocist (OPG) v vzorcih iztrebkov (n=214) po zdravljenju

Parazit	Mediana	1. in 3. kvartil	Min. in max. število	Pozitivni vzorci (%)
<i>Eimeria</i> spp.	350	150, 812	50, 32400	88,79
Strongylida	200	100, 600	50, 9700	51,40
<i>Strongyloides papillosus</i>	0	0, 0	0, 0	1,87
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0, 0	0, 0	1,40
<i>Moniezia</i> spp.	50	50,50	50,50	3,74

Tabela 4: Prisotnost jajčec ostalih parazitov v vzorcih iztrebkov (n=214) po zdravljenju

Parazit	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	<i>Trichuris</i> spp.	Protostrongylidae	<i>Capillaria</i> spp.	<i>Skrjabinema</i> spp.	<i>Paramphistomum</i> spp.
Pozitivni vzorci (%)	15,42	9,35	24,30	1,40	1,40	1,87



Tabela 5: Rezultati vprašalnikov in odgovori rejcev so predstavljeni v odstotkih

Vprašanje	Odgovor	Odstotki (%)
Način vhlevitve živali?	Vhlevljene skupaj	60
Ali pasete odrasle živali skupaj z mladimi?	Da	84
Način pokladanja krme?	V jasli	97
Kakšni so vaši pašniki?	Suhi	81
Pogostost odstranjevanja iztrebkov v hlevu	1x letno	34
	1x na tri mesece	30
Kolikokrat letno zdravite drobnico z zdravili proti parazitom?	Dvakrat	50
	Nikoli	1
Na osnovi česa se odločite za zdravljenje proti parazitom	Predhodne izkušnje	70
	Zdravim, če so živali slabe	30
V katerem obdobju leta zdravite živali proti parazitom?	Spomladi	60
	Nimamo načrta zdravljenja	10
Ali dobijo antiparazitike vse živali v tropu?	Da	70
	Ne, samo odrasle živali	23
Kdo zdravi živali z antiparazitiki?	Sami	75
Kako dozirate antiparazitike?	Dozo določimo za vsako žival posebej glede na njeno težo	77
Kako določite težo živali?	Vizualno	89
Ali vsakokrat uporabljate enako zdravilo za zatiranje parazitov?	Da	48

## Razprava

Pri našem delu smo ugotovili, da je pojavnost določenih jajčec parazitov zelo primerljiva s študijo, ki so jo opravili leta 2012 v 27 rejah na Danskem. Kot primer lahko vzamemo odstotek pojavnosti *Eimerie spp.*, ki se je v njihovih rejah pojavila v 100%, pri nas pa v 85,3%. Zelo blizu sta si tudi odstotka razvojnih oblik jajčec, parazitov *Nematodirus spp.* (Danska 14,8%, Slovenija 14,2%), *Moniezia spp.* (Danska 7,4%, Slovenija 9,5%) in *Strongylida* (Danska 81,5%, Slovenija 90,2%) (3).

Na podlagi rezultatov iz anket smo ugotovili, da ima večina rej skupaj vhlevljene živali in ravno tako večina rejcev pase živali skupaj, kar z vidika invazije s paraziti lahko vpliva na slab rezultat, saj vemo, da se paraziti prenašajo z ličinkami, ki se razvijejo iz jajčec v iztrebkih. Zanimiv rezultat je bil tudi, da velika večina rejcev krmo polaga v jasli in ne na tla, kar je pozitivno, saj se s tem zmanjša tveganje kontaminacije krme. Večina anketiranih pase živali na suhih pašnikih, kjer je večja možnost invazije z malim metljamem, pri katerem se živali invadirajo z zaužitjem metacerkarij v mravljah. To nam potrjujejo tudi rezultati preiskav, saj je bil v četrtini vzorcev prisoten *Dicrocoelium dendriticum* (1).

Glede zdravljenja živali, ki ga več kot polovica rejcev opravi dvakrat letno, nas je zanimalo predvsem ali imajo opravljen načrt zdravljenja in kdo opravlja zdravljenje ter kako. Rezultati analiz vzorcev, odvzetih po zdravljenju, večkrat niso bili veliko boljši glede na rezultate analiz vzorcev odvzetih pred zdravljenjem. Slab uspeh zdravljenja lahko pripisujemo dejstvu, da velika večina anketirancev zdravi živali sama, da se za doziranje

antiparazitikov odloči na podlagi teže živali, ki jo določijo vizualno. Navedeno lahko vodi do napak pri doziranju in nastanka rezistence, kar so ugotovili tudi v različnih državah severne Evrope, kjer so odkrili povečano rezistenco parazitov zaradi neprimerne strategije zdravljenja (2,4).

Prvič je bilo pri nas na tak način sistematično pregledanih večje število rej ovc in koz. Z opravljenim delom smo dobili podatke o stanju v rejah, prisotnosti parazitov, njihovi raznovrstnosti in načinu zatiranja.

## Reference

1. Pogačnik M in sod. Zdravje in bolezni drobnice. Ljubljana: Kmečki glas, 1998: 200-8.
2. Domke A, Chartier C, Gjerde B, Leine N, Vatn S, Østerås O, Stuen S. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011; 53:29-37.
3. Holm S A, Sørensen C R L, Thamsborg S M, Enemark H L. Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. *Parasite* 2014; 21: 37-45.
4. Fraser DE, Hunt PJ, Skinner R J, Coles G C. Survey of parasite control on sheep farms in south-west England. *Veterinary Record* 2006; 158: 55-7.

## Parasitism in small ruminants

In small ruminants parasitism represents quite a problem that affects the animal's health status and causes substantial economic loss to breeders. In the paper shall be presented the preliminary results of the research work, running for the Prešeren Award. The research work has set out two objectives: firstly, collect data on the presence of parasites or rather parasite's ova as well as other development forms of lungworms (L1 larvae) and secondly, research ways on how the breeders control parasites in small ruminants throughout the entire territory of Slovenia. During the research questionnaires have been used in order to obtain the desired rearing data as well as data on parasite control. The coprological examinations (sedimentation, flotation, Vajda's and MacMaster method), on the other hand, were used to establish the presence of parasites in the examined herds. 133 breeders have adhered and filled in the on-line questionnaires. The coprological examinations were applied on 409 faeces samples before and 214 samples collected after the treatment with anthelmintic drugs. In 90.22% of samples we were able to establish the presence of Strongylida ova before any medical treatment and 85.33% of samples tested, resulted positive for *Eimeria* oocytes. Up until the present moment, in Slovenia was not performed such a systematic and large scale examination of sheep and goat herds. The work carried out during this research has given a broader insight into rearing practices, the presence of parasites, their variety and different ways of parasites control.

Key words: small ruminants; endoparasites; coprological examination

# MODELIRANJE ŠIRJENJA KUŽNIH BOLEZNI: PRIMER BOLEZNI MODRIKASTEGA JEZIKA V SLOVENIJI

Tanja Knific<sup>1\*</sup>, Tadej Malovrh<sup>1</sup>, Marko Potočnik<sup>2</sup>, Matija Pretnar<sup>3</sup>, Milica Krkovič<sup>3</sup>, Aljoša Vodopija<sup>3</sup>, Jasna Prezelj<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, <sup>2</sup>Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Ljubljana, <sup>3</sup>Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, <sup>4</sup>Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem, Koper, Slovenija

tanja.knific@vf.uni-lj.si

Z matematičnim modeliranjem lahko na podlagi obstoječih informacij pojasnimo in napovemo vzorce pojavljanja boleznih ter kvantitativno ocenimo tveganje za vnos in širjenje boleznih na specifičnem področju. Poleg tega modeli omogočajo tudi oceno verjetnih posledic alternativnih strategij nadzora boleznih. Zaradi liberalizacije trgov in gospodarskih trendov postaja dokazovanje upravičenosti ukrepov za preventivo in nadzor boleznih vedno bolj pomembno. V prispevku podajamo primer razvoja matematičnega modela za širjenje boleznih modrikastega jezika (BMJ) v Sloveniji. Razviti model je v osnovi razredni oziroma SIR model (*ang. Susceptible-Infectious-Recovered model*), razširjen s parametri, ki omogočajo modeliranje vplivov vektorja, mušic iz rodu *Culicoides* spp. in okoljskih vplivov. Končni uporabnik lahko preko vmesnika s pripravljeno simulacijo preigra različne možne scenarije poteka boleznih glede na lokacijo izbruha, vremenske in druge razmere, oceni hitrost in smer širjenja in tako določi obseg potrebnih virov za obvladovanje izbruhov ter oceni posledice potencialnega izbruha boleznih. Pri interpretaciji rezultatov modela je potrebno upoštevati privzete predpostavke in vrednosti nastavljivih parametrov. Predstavljeni model je prvi te vrste v naši državi in bi lahko v kombinaciji z ekonomskimi ocenami v prihodnosti služil za zagotavljanje aplikativnih nasvetov za podporo pri odločanju in s tem k dobro informiranim odločitvam o politiki nadzora boleznih živali.

**Ključne besede:** Matematično in epidemiološko modeliranje; SIR model; bolezen modrikastega jezika

## Uvod

Kužne bolezni rejnih živali lahko pomenijo nevarnost za zdravje ljudi (zoonoze) in živali. Zaradi vpliva na prihodek, trge in trgovanje predstavljajo potencialno tveganje velikih izgub za gospodarstvo, posredno pa tudi za potrošnike in davkoplačevalce. Glavni namen epidemioloških raziskav je najti način kako minimizirati ekonomski vpliv boleznih (James, 2005), vendar je zaradi številnih dejavnikov, ki vplivajo na pojavljanje boleznih in kompleksnega socioekonomskega okolja, ocenjevanje tveganja širjenja boleznih ter možnih posledic za ljudi in živali težavno in drago. Matematično modeliranje je v veterinarski epidemiologiji že dolgo prepoznano kot pomemben komplementarni pristop. Bistvo matematičnega modeliranja je, da realni sistem poenostavimo do tolikšne mere, da ga lahko sistematično analiziramo in opišemo z matematičnimi formulami.

Z modeli skušamo na podlagi obstoječih informacij pojasniti in napovedati vzorce pojavljanja boleznih ter oceniti verjetne posledice alternativnih strategij nadzora boleznih

(Thrusfield, 2007). Analiziramo lahko kužne ali produkcijske bolezni na osnovi različne epidemiološke enote (na ravni črede ali določene regije). Matematično modeliranje pripomore k boljšemu razumevanju epidemiologije bolezni, saj moramo strukturirano prikazati ključna vzročna posledična razmerja (Dohoo in sod., 2009). Poleg tega pokaže področja negotovosti, kjer so potrebna specifična znanja. Računalniške simulacije so posebno uporabne zaradi pomanjkanja empiričnih podatkov in kadar dejanskega poskusa ni možno izvesti.

V prispevku podajamo primer razvoja matematičnega modela za širjenje bolezni modrikastega jezika (BMJ) v Sloveniji. BMJ je sezonska, nenalezljiva, vektorsko prenosljiva bolezen. Primarno za BMJ zbolijo drobnica, govedo in divji prežvekovalci. Razširjenost bolezni po svetu je odvisna od življenjskega prostora vektorja, mušic iz rodu *Culicoides* spp. in od okoljskih dejavnikov, predvsem temperature (Kahn in Line, 2010).

## Material in metode

Cilj projekta je bil razviti matematični model, ki bo zadovoljivo opisal širjenje BMJ v Sloveniji. V ta namen smo smiselno priredili enega od najosnovnejših epidemioloških modelov - SIR model (*ang. Susceptible-Infectious-Recovered model*), ki dano populacijo razdeli na več skupin oziroma razredov glede na epidemiološki status posamezne živali. Tako dobimo razredni model, ki ga sestavljajo dovzetne, okužene in ozdravljene živali. Model smo razvili v programu R 3.2.5 (april, 2016). Program je v osnovi namenjen statističnim in matematičnim izračunom, vendar je zaradi razširitev v obliki paketov, odprtost in prostega dostopa njegova uporaba vedno bolj razširjena tudi v veterinarski epidemiologiji.

Za razvoj modela je bilo potrebno urediti in analizirati veliko količino podatkov ter ustrezno pripraviti vhodne parametre. Podatke, specifične za naše področje, smo pridobili iz Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (podatki o gospodarstvih, reji posameznih vrst živali, transportu živali, rabi in površini zemljišč), Nacionalnega veterinarskega inštituta (podatki o številu vektorjev po posameznih lokacijah) in Katedre za meteorologijo Fakultete za matematiko in fiziko (podatki o vetru, padavinah, vlagi in temperaturi). Ostale podatke o epidemioloških značilnostih povzročitelja in širjenju bolezni smo pridobili iz objavljene literature (Nunamaker in sod., 1997; Gerry in sod., 2001; O'Connell, 2002; DEFRA, 2002; Carpenter in sod., 2006; Gubbins in sod., 2008; Hartemink, 2009; Santman-Berends in sod., 2013; Elbers in sod., 2014). Ti podatki so navadno pridobljeni ali ocenjeni za področje, na katero se opravljena študija nanaša, zato smo za naše potrebe nekatere podatke prilagodili in utežili s pomočjo ekspertnih ocen.

Ker za BMJ ni vnaprej izdelanih računalniških orodij, smo sistem parcialnih diferencialnih enačb nadomestili s sistemom krajevno soodvisnih diferenčnih enačb in pri tem upoštevali različne robne in začetne pogoje, ki se pojavijo ob izbruhih bolezni in so odvisni od razloga za izbruh: če je razlog pojav okuženih vektorjev, ki jih prinese veter, to zahteva drugačen model, kot če je razlog okužbe vnos okuženih živali v državo.

## Rezultati

Model smo razvili za področje Slovenije, ki je razdeljen na mrežo z robom 1 km, na kateri smo v določenih časovnih intervalih sledili šestim parametrom: številu zdravih in okuženih vektorjev ter številu zdravih in okuženih gostiteljev (ločeno za drobnico in govedo). Za začetne podatke smo vzeli povprečno število gostiteljev iz triletnega staleža in privzeli, da je populacija konstantna. Na vsakem koraku simulacije smo hkrati modelirali vse faktorje razvoja bolezni: prenose z vektorja na gostitelje in obratno, nataliteto vektorja ter selitve

vektorja zaradi vetra. Iz števil okuženih vektorjev in zdravih gostiteljev smo izračunali število na novo okuženih gostiteljev ter ustrezno spremenili število zdravih in okuženih gostiteljev. V modelu so posamezni vplivni faktorji kontrolirani s parametri, ki se jih lahko spreminja.

Na podlagi dostopnih podatkov (Gerry in sod., 2001; Gubbins in sod., 2008; osebna korespondenca s strokovnjakom iz Pirbright Instituta) smo upoštevali: 1) vektorji gredo na govedo 9,4-krat pogosteje kot na drobnico, 2) stopnja okuženosti populacije vektorjev je 1 – 2 % in 3) vektor v povprečju piči 0,17-krat na dan (NP – nagnjenost k piku). Populacijo vektorjev smo modelirali na vsakem kvadratnem kilometru glede na gostoto drobnice in goveda ter glede na relief. Po ocenah (Elbers in sod., 2014) pride na eno govedo v povprečju do 2.500 vektorjev. V modelu je ta parameter nastavljen na  $K = 900$ , vendar je spremenljiv. Faktor rasti populacije vektorjev je nastavljen in časovno odvisen. Prenos vektorjev z vetrom smo modelirali z uporabo linearizacije in diskretizacije. Model je na danem  $\text{km}^2$  naslednji: verjetnost okužbe zdravega gostitelja  $P_{GZ}$  je enaka

$$P_{GZ} = 1 - (1 - P_{VG})^{PVO_G},$$

pri čemer je  $P_{VG}$  verjetnost prenosa bolezni z vektorja na gostitelja pri enem piku okuženega vektorja in kjer je število pikov okuženega vektorja na dan na gostitelja  $PVO_G$  enako

$$PVO_C = \frac{9,4}{10,4} \frac{VO}{C+D} \times NP \text{ in}$$

$$PVO_D = \frac{1}{10,4} \frac{VO}{C+D} \times NP,$$

pri čemer je VO okuženi vektor, gostitelji pa so govedo C in drobnica D. Izračun števila zdravih in okuženih gostiteljev je sledeč:

$$NGO_t = GZ_t \times P_{GZ},$$

$$GO_{t+1} = GO_t + NGO_t,$$

$$GZ_{t+1} = GZ_t - NGO_t,$$

pri čemer je  $NGO_t$  število na novo okuženih gostiteljev,  $GZ_t$  staro število zdravih gostiteljev,  $GO_{t+1}$  novo število okuženih gostiteljev,  $GO_t$  staro število okuženih gostiteljev in  $GZ_{t+1}$  novo število zdravih gostiteljev.

Podobno smo zaradi prenosa z okuženih gostiteljev na zdrave vektorje spremenili število zdravih in okuženih vektorjev. Nato smo število obeh skupin vektorjev spremenili ustrezno glede na stopnjo natalitete:

$$VZ_{t+1} = VZ_t \times R_V,$$

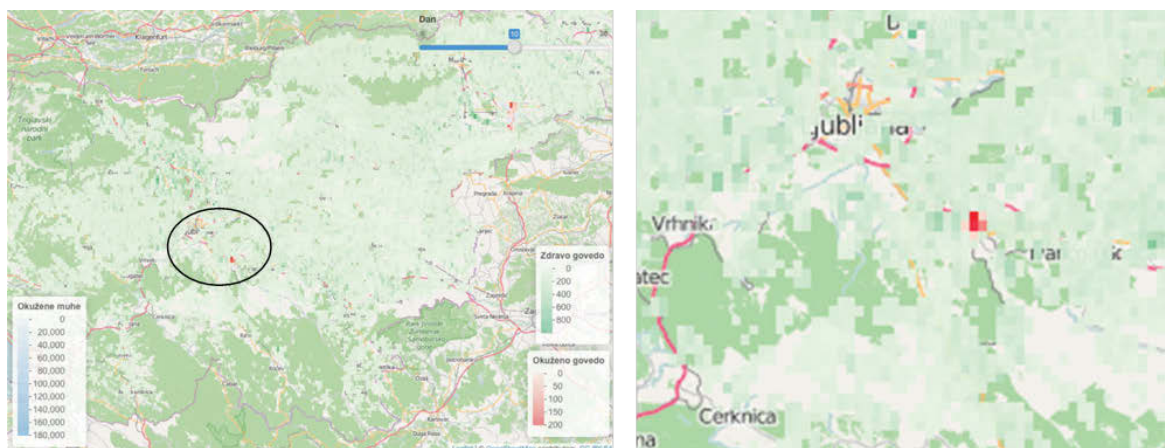
$$VO_{t+1} = VO_t \times R_V,$$

pri čemer je  $VZ_{t+1}$  novo število zdravih vektorjev,  $VZ_t$  staro število zdravih vektorjev,  $R_V$  stopnja natalitete,  $VO_{t+1}$  novo število okuženih vektorjev in  $VO_t$  staro število okuženih vektorjev.

Nazadnje smo populacijo vektorjev glede na velikost in smer vetra razporedili po sosednjih poljih, pri čemer smo vse vektorje, ki jih je veter zanesel na neustrezna območja, izničili.

Število korakov simulacije je bilo odvisno od opazovanega časa okužbe in hitrosti vetra. Višja hitrost vetra je namreč zahtevala večjo časovno natančnost, saj smo morali paziti, da je na vsakem koraku veter vektorje zanesel kvečjemu na sosednja polja mreže.

Ob zagonu programa se uporabnik lahko odloči za prikaz že poprej izračunanega modela ali izračun novega. Pri izračunu novega prek grafičnega uporabniškega vmesnika najprej nastavi vrednosti parametrov (opazovalni čas okužbe, lokacije okužbe in število začetnih okuženih živali, verjetnosti prenosa bolezni, število in nataliteta vektorjev in drugih). Po vnesenih parametrih uporabnik zažene izračun. Med izračunom uporabnik sproti vidi napredek simulacije, saj ta zaradi natančnosti lahko traja tudi več minut. Rezultati poprej ali na novo izračunanega modela se prikažejo na zemljevidu Slovenije (Slika 1). Uporabnik lahko prek grafičnega vmesnika izbira dan prikaza in podatke, ki jih želi videti (na primer število okuženih vektorjev, število okuženega goveda) Ker so podatki vnaprej izračunani, so spremembe prikaza takojšnje.



Slika 1: Primer prikaza vmesnega rezultata modeliranja širjenja BMJ na področju Slovenije; levo – prikaz na zaslonu, desno – povečava izbranega področja.

## Razprava

Namen projekta je bil pripraviti prikaz računalniške simulacije širjenja BMJ kot primer uporabe matematičnega modeliranja za ocenjevanje tveganja širjenja kužnih bolezni pri živalih. Končni uporabnik lahko preko vmesnika s pripravljeno simulacijo preigra različne možne scenarije poteka bolezni glede na lokacijo izbruha, vremenske in druge razmere, oceni hitrost in smer širjenja in tako določi obseg potrebnih virov za obvladovanje izbruhov ter oceni posledice potencialnega izbruha bolezni. Pri interpretaciji rezultatov modela je potrebno upoštevati privzete predpostavke in vrednosti vseh nastavljenih parametrov.

Kljub dostopnemu znanju in raznovrstni metodologiji sta matematično modeliranje in veterinarska epidemiologija premalokrat uporabljeni pri načrtovanju in upravljanju zdravstvenega varstva živali. James (2005) izpostavlja, da so mnoge javne službe in zasebne prakse v veterini pomanjkljivo ozaveščene o potencialu epidemioloških in ekonomskih analiz ter jim pogosto pripisujejo bolj akademski pomen. Aplikacija matematičnega in epidemiološkega modeliranja omogoča pripravo celostnih analiz vplivov bolezni živali, ki se uporabljajo za podporo pri odločanju in pri optimizaciji zdravstvenih zavarovanj, nadzora ali izkoreninjanja bolezni (Thrusfield, 2007). Pri tem je pomembno razumeti, da precejšen del izgub nastane kot posledica človeških dejanj, kot je na primer prepoved premikov živali ali omejitve mednarodne trgovine (Rushton, 2009).

Del projekta je bil opravljen v okviru programa »Po kreativni poti do praktičnega znanja«, sofinanciranega s strani Javnega sklada RS za razvoj kadrov in štipendije.

## Reference

Dohoo I, Medley G. Concepts of infectious disease epidemiology. In: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research, 2<sup>nd</sup> Edition. Prince Edward Island, Canada: VER Inc, 2009: 716-25.

Hartemink NA. Vector borne diseases: the basic reproduction number  $R_0$  and risk maps. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2009.

Thrusfield M. Veterinary Epidemiology, 3<sup>rd</sup> Edition. Edinburgh: Blackwell Science Ltd, 2007: 352-6.

## Modelling of infectious diseases: The case of bluetongue disease in Slovenia

The mathematical modelling enables the explanation and prediction of disease occurrence and quantitative risk assessment for the introduction and spread of a disease in a specific area based on existing information. In addition, the models can be used for assessment of possible consequences of the alternative control strategies. Due to the market liberalization and economic trends the justification of preventive and control measures is becoming increasingly important. This paper presents an example of the development of a mathematical model for the spread of bluetongue disease in Slovenia. The developed model is based on the Susceptible-Infectious-Recovered (SIR) model which was extended with the parameters that allow for modelling of the effects of vector midges of the genus *Culicoides* spp. and environmental impacts. The end user can modify settings in the interface to simulate different possible scenarios of the spread depending on the outbreak location, weather and other conditions, estimate the direction and speed of the spread and thus determine the resources required to manage an outbreak and evaluate the impact of a potential outbreak. When interpreting the results of the model one should consider the underlying assumptions and the values of adjustable parameters. The presented model is the first of this type in Slovenia and could, in combination with economic assessments, provide useful additional information for animal health policy decision making.

Key words: mathematical and epidemiological modelling; SIR model; bluetongue disease

# DOKAZ PRIMEROV OBOLELIH ŽIVALI Z MUKOZNO BOLEZNIJO V SLOVENIJI

Vasilij Cociancich\*, Tomislav Paller, Ivan Toplak

Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbčeva 60, Ljubljana, Slovenija

vasilij.cociancich@vf.uni-lj.si

Bovina virusna diareja (BVD) je zelo nalezljiva virusna bolezen goveda, ki se v pozitivni reji kaže s spektrom zelo različnih kliničnih znakov. V okuženi reji lahko le perzistentni izločevalci virusa BVD klinično zbolijo za mukozno boleznijo in potem vsi poginejo. Ugotovitev mukozne boleznij v reji je veterinarju pomemben signal, da je reja okužena. V študijo smo vključili 10 vzorcev živali, pri katerih smo, na podlagi značilnih kliničnih znakov, postavili sum na mukozno bolezen. Z metodo RT-PCR smo prisotnost nukleinske kisline virusa BVD dokazali v vseh 10 vzorcih. V nadaljevanju smo na celični kulturi iz 8 vzorcev izolirali necitopatogeni (NCPE) sev in iz 5 vzorcev NCPE in citopatogeni (CPE) par seva virusa BVD. Izolacija petih CPE sevov virusa BVD je pomembna tudi za stroko, zaradi dopolnitve nacionalne zbirke izolatov s CPE sevi in zaradi možnosti uporabe teh sevov v virus - nevtralizacijskem testu.

Ključne besede: virus bovine virusne diareje; mukozna bolezen; patologija; diagnostika; citopatski efekt

## Uvod

Bovina virusna diareja (BVD) je zelo nalezljiva virusna bolezen parklarjev. Okužba z virusom BVD je v govejih čredah pogosto prisotna, vendar je klinično zaznanih primerov malo. V naravi se pojavljata dva biotipa virusa BVD (BVDV), *citopatogeni* (CPE) in *necitopatogeni* (NCPE). NCPE sevi BVD povzročijo večino okužb živali in jih pogosto izoliramo iz različnih organov, medtem ko CPE seve BVD le redko ugotovimo, izoliramo pa jih le pri obolelih živalih s t.i. mukozno boleznijo. Pri takšni živali je skupaj z NCPE sevom izoliran še CPE sev, govorimo o t.i. paru NCPE/CPE sevov BVD pri mukozni bolezni (1).

Okužba goveda z virusom BVD povzroča tri oblike bolezni, ki imajo zelo širok spekter kliničnih znakov, od zelo blagih, nezaznavnih, pa do zelo težkih oblik bolezni, ki se končajo s smrtjo obolele živali.

Kongenitalna oblika je posledica okužbe ploda z NCPE sevom virusa BVD v prvi tretjini brejosti, ko plod še nima razvitega imunskega sistema. Teleta, ki preživijo to okužbo, se rodijo kot perzistentni izločevalci (PI) virusa BVD. Takšna teleta so navidezno zdrava ali pa zaostajajo v rasti za vrstniki. Največkrat poginejo v prvih tednih po porodu in redko dosežejo spolno zrelost. PI so do smrti stalni izločevalci virusa BVD in glavni vir okužbe za neokužene živali.

Akutna oblika BVD je posledica okužbe dovzetne živali kdajkoli po rojstvu z NCPE ali CPE sevom BVD. Viremija traja od 3 do 10 dni, potem pa žival pridobi specifična protitelesa in virusa pri oboleli živali več ne ugotovimo. Klinično se v okuženi reji kaže z enterično in respiratorno obliko največkrat pri teletih, ob prvem vnosu virusa v rejo



pa zbolijo vse starostne skupine. Pri bregih živalih so zaznavne reprodukcijske motnje in različne anomalije v razvoju plodu. Mukozna bolezen je posledica okužbe PI živali z CPE sevom BVD. Ta v večini primerov nastane v PI z delecijo, insercijo ali točkovno mutacijo v delu genoma NCPE virusa, kar povzroči nastanek še CPE seva. Klinično obolela žival z mukozno boleznijo ima v krvi CPE in NCPE par virusa BVD (2). V okuženi reji le PI zbolijo za mukozno boleznijo in vsi poginejo. Vsekakor je klinični pojav mukozne boleznijo izkušenemu veterinarju pomemben signal, da je reja okužena z virusom BVD. Prisotnost mukozne boleznijo pri oboleli živali laboratorijsko zanesljivo potrdimo z izolacijo CPE virusa BVD na celični kulturi. Laboratorijska potrditev, da je žival poginila za mukozno boleznijo za rejca ali veterinarja nima velikega praktičnega pomena, zato se diagnostika običajno konča že z dokazom prisotnosti virusa BVD. Izolacija CPE sevov BVD je zahtevna in draga, s stališča laboratorija pa so CPE sevi zanimivi zaradi ugotavljanja genetske osnove, ki določa nastanek citopatogenosti, pa tudi za potrebe virus - nevtralizacijskega testa v primeru študij ugotavljanja protiteles, saj so titri specifičnih protiteles ugotovljeni s homolognimi sevi BVD višji.

## Materiali in metode

Med leti 2006 in 2016 smo na podlagi opisa klinične slike 10 obolelih živali s sumom na mukozno bolezen s strani veterinarja ali patologa, zbrali vzorce serumov (5 živali) in vzorce organov (5 živali). Pri raztelesbi 5 poginjenih živalih smo natančno zabeležili patoanatomske spremembe in odvzeli vzorce (vranica, bezgavke) za virološke preiskave.

Za dokaz prisotnosti virusa BVD smo iz vzorcev organov najprej pripravili 10% suspenzijo v RPMI 1640 (Gibco). Nukleinsko kislino smo iz 10 vzorcev izolirali s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca in prisotnost nukleinske kisline virusa BVD dokazovali z metodo RT-PCR (3).

Izolacijo virusa BVD smo izvajali na primarni celični kulturi turbinalnih celic (TB) po standardnem postopku izolacije. Na kratko: Izolacijo smo izvajali v mikroploščah s 96 jamicami. Na dan star sloj celic TB smo nanесли po 100 µl preiskovanega vzorca (serum ali suspenzijo organov) v dve jamici/vzorec in naredili dvakratne razredčitve do konca jamic po mikroplošči. Za pozitivno kontrolo smo uporabili CPE sev NADL, za negativno kontrolo nam je služil sloj neinokuliranih celic TB. Mikroplošče smo inkubirali 5 – 7 dni v inkubatorju pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, ter dnevno pod mikroskopom spremljali stanje celic in pojav CPE v jamicah. Opravili smo dve pasaži in nato mikroplošče fiksirali s 85% acetonom (4). Pomnoževanje virusov BVD smo dokazovali s peroksidaznim testom, z uporabo monoklonskih protiteles WB 103/105 (APHA, Weybridge, Velika Britanija) in konjugiranih anti-mišjih protiteles P260 (Dako).

## Rezultati

Starost oboleli živali s sumom na mukozno bolezen je bila od 4 do 29 mesecev. Pri raztelesbi smo ugotovili patološke spremembe, ki so značilne za mukozno bolezen: močna polnokrvnost, krvavitve in erozije v ustni votlini in na smrčku, diseminiran erozivni gastroenteritis, pikčaste krvavitve in sufuzije pod serozami, črevesna vsebina je bila redka, krvava, sluzasta in izrazito neprijetnega vonja.

Z metodo RT-PCR smo v vzorcih vseh 10 živali dokazali produkt velikosti 300 baznih parov, kar potrjuje prisotnost nukleinske kisline virusa BVD v vzorcih vseh 10 obolelih živali.

V izolaciji virusa na celični kulturi TB smo pri 8 živalih izolirali NCPE virus in v 5 vzorcih

par CPE/NCPE virusa BVD. Pri NCPE virusih smo v peroksidaznem testu dobili jasno rdeče obarvano citoplazmo, jedra pa so bila svetla. Vse CPE viruse BVD smo zaznali že v prvi ali drugi pasaži, po 48 do 120 urah po inokulaciji, v jamicah prvih 4 razredčitev pa je sloj celic kazal 100% CPE. Pri naslednji pasaži smo ugotovili CPE v večini inokuliranih jamic. Ostanki celic po nastalem CPE so se v peroksidaznem testu obarvali rdeče.

## Razprava

Mukozna bolezen je redko laboratorijsko potrjena klinična slika na terenu, ki pa jo veterinarji praktiki v povezavi z BVD okužbami govejih čred pri nas že dobro prepoznajo. Dokaz prisotnosti virusa z metodo RT-PCR je gotovo dovolj, da po postavitvi suma na mukozno bolezen potrdimo vzrok obolenja. Redko pa gremo v laboratoriju z diagnostiko še naprej in poskušamo z izolacijo CPE virusa BVD, ki je neposreden dokaz, da je žival zbolela z mukozno boleznijo. CPE seve BVD namreč ugotovimo samo pri živalih, ki so klinično obolele z znaki mukozne bolezni. Izolacija virusa je v primerjavi z molekularno metodo RT-PCR manj občutljiva, saj pri izolaciji dokazujemo infektivnost virusa, ki pa je lahko prizadeta zaradi starosti trupla in časa, ki poteče od pogina do prinosa vzorca v laboratorij. Zato je izolacija virusa BVD iz 8 od 10 preiskovanih vzorcev pričakovan rezultat, ki potrjuje višjo občutljivost metode RT-PCR. Uspešna izolacija CPE seva pri 5 od 10 vzorcev s sumom na mukozno bolezen pa je prav tako dober rezultat, ki potrjuje predhodne ugotovitve avtorjev (1, 2). Izolacija CPE sevov je zanimiva tudi za stroko zaradi dopolnitve naše nacionalne zbirke izolatov BVD, s stališča znanosti pa zaradi genetske podlage, ki je odgovorna za spremembo seva iz NCPE v CPE sev virusa BVD. Tega v izvedeni študiji nismo ugotavljali, z metodo naslednje generacije sekvenciranja (NGS) pa bi lahko s primerjavo NCPE in CPE sevov ugotovili tudi spremembo v genomu, ki je odgovorna za nastanek naših CPE sevov. Izolirani CPE sevi BVD bodo lahko v prihodnje uporabljeni tudi v laboratorijski diagnostiki pri izvedbi virus-nevtralizacijskih testov kot terenski sevi za dokazovanje protiteles proti virusu BVD.

## Reference

1. Brownlie J Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 1984; 114: 535-6.
2. Brownlie J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *J Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1990; 9: 43-59.
3. Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Mrkun J. The usefulness of two molecular methods for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea using oral swab samples. *Slov Vet Res* 2015; 52: 23-30.
4. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi: doktorska disertacija. 2004.

## Detection of animals with mucosal disease in Slovenia

Bovine viral diarrhoea (BVD) is a highly contagious viral disease of cattle that shows a very different spectrum of clinical signs in positive herds. In the infected herd only persistently infected animals can present clinical signs of mucosal disease and then all die. Finding of animal with mucosal disease in a herd is an important sign for vet that

herd is infected with BVD. In this study we have included 10 samples of animals which were selected with typical clinical signs, suspicious for mucosal disease. The presence of nucleic acid of BVD virus was demonstrated by RT-PCR in all 10 samples. Below we have isolated noncytopathic strain (NCPE) on cell culture from 8 samples and from 5 samples NCPE and cytopathic (CPE) BVD virus pair. Isolation of five CPE strains of BVD virus is also important for the profession, in order to supplement the national collection of isolates with CPE strains and for the possible use of these strains in the virus - neutralization test.

Key words: bovine viral diarrhea virus; mucosal disease; pathology; diagnosis; cytopathic effect

# UGOTAVLJANJE SUBKLINIČNIH PRESNOVNIH MOTENJ KRAV MOLZNIC

Jožica Ježek\*, Marija Nemec, Martina Klinkon, Jože Starič

Klinika za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jozica.jezek@vf.uni-lj.si

Presnovne bolezni se najpogosteje pojavljajo v obporodnem obdobju krav še zlasti v prvih šestih tednih po telitvi. Presnovne bolezni že v subklinični obliki negativno vplivajo na mlečnost, plodnost in dobro počutje krav. V raziskavi smo analizirali rezultate biokemijskih preiskav krvnih vzorcev krav iz rej, ki so imele težave s plodnostjo. Analizirali smo rezultate vzorcev 453 krav različnih pasem iz 162 rej. Merili smo vsebnost celotnih serumskih beljakovin (CSB), albuminov (Alb), uree, kalcija (Ca), anorganskega fosfata (aP), natrija (Na), kalija (K), klora (Cl) in beta-karotina. Rezultate smo primerjali z referenčnimi vrednostmi za krave. Srednje vrednosti preiskovanih parametrov so bile v mejah referenčnih vrednosti. Pri rezultatih posameznih krav smo najpogosteje ugotovili odstopanja od referenčnih vrednosti pri vsebnosti CSB (47,8% krav), uree (64,7% krav), aP (39,7% krav), K (27,2% krav) in beta-karotina (36,0 % krav). Na ugotovljena odstopanja lahko vplivajo različni dejavniki (zdravstveno stanje, prehrana). Glede na rezultate menimo, da so subklinične presnovne bolezni kar pogoste v naših čredah zato bi bilo smiselno izvajati reden nadzor zlasti v rejah z zdravstvenimi in reprodukcijskimi težavami.

Ključne besede: govedo; kri; biokemija

## Uvod

V obporodnem obdobju je metabolizem krav najbolj obremenjen in podvržen t.i. metaboličnemu stresu. V tem obdobju se najpogosteje pojavljajo različne presnovne bolezni (ketoza, hipokalcemija), ki lahko potekajo v subklinični ali klinični obliki. Presnovne motnje povečajo verjetnost nastanka drugih bolezni (infekcijske bolezni, dislokacija siriščnika) in negativno vplivajo na plodnost in mlečnost krav (1, 2). Biokemijske preiskave krvi so koristne pri diagnostiki in oceni zdravstvenega in presnovnega statusa ter oskrbljenosti krav.

V raziskavi smo želeli oceniti zdravstveno stanje krav v rejah s plodnostnimi motnjami. Analizirali smo rezultate biokemijskih preiskav krvnih vzorcev krav, ki smo jih prejeli v preiskavo.

## Materiali in metode

V raziskavi smo analizirali rezultate biokemijskih preiskav krvnih vzorcev krav (n=453), ki so jih poslali v naš klinični laboratorij zaradi plodnostnih motenj v čredi. Krave so bile različno stare in vzorci so bili odvzeti v različnih letnih obdobjih. Krave so izvirale iz 162 rej z različnim načinom reje in različno mlečnostjo.

V vzorcih krvnih serumov smo z biokemijskim analizatorjem RX Daytona (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) izmerili vsebnost celotnih serumskih beljakovin (CSB), albuminov (Alb), uree, kalcija (Ca), anorganskega fosfata (aP), natrija (Na), kalija (K) in klora (Cl). Vsebnost beta-karotina smo izmerili fotometrično z metodo po Yudkinu.

Statistično analizo podatkov smo izvedli s programom SPSS (Ver 22.0, SPSS, ZDA). Izračunali smo opisno statistiko (srednjo vrednost, standardno deviacijo, minimum in maksimum). Podatke posameznih krav smo primerjali z referenčnimi vrednostmi za posamezen parameter in izračunali odstotek krav, katerih vzorci so odstopali od referenčnih vrednosti.

## Rezultati

Srednje vrednosti preiskovanih biokemijskih parametrov so bile v mejah referenčnih vrednosti, ki jih uporabljamo v našem kliničnem laboratoriju. Pri analizi rezultatov posameznih vzorcev smo pri nekaterih vzorcih posameznih živali ugotovili odstopanja od referenčnih vrednosti kar je pomembno za interpretacijo.

Ugotovili smo, da so preiskovani vzorci najpogosteje odstopali od referenčnih vrednosti glede vsebnosti CSB (47,8%), uree (64,7%), aP (39,7%), K (27,2%) in beta-karotina (36,0%).

## Razprava

Analizirali smo rezultate krvnih vzorcev krav, ki so imele plodnostne motnje. Predvidevamo, da so bile krave klinično zdrave in da rezultati, ki odstopajo od referenčnih vrednosti kažejo predvsem subklinične presnovne motnje.

Pri analizi rezultatov posameznih krav smo pri 25,2 % ugotovili prenizko vsebnost CSB in pri 47,9% prenizko vsebnost uree. Koncentracija CSB in uree je povezana z oskrbo z beljakovinami (4) nižjo vsebnost pa lahko ugotovimo tudi pri slabi ješčnosti krav. Pri 22,6% krav je bila vsebnost CSB nad referenčno vrednostjo, kar je lahko povezano z vnetjem, kjer se vsebnost globulinov zviša in vpliva na višjo vsebnost CSB (3, 4). Druga možnost je nezadostna oskrba živali z vodo in dehidracija, pri kateri ugotavljamo hkrati tudi povišano vsebnost albuminov v krvi.

Pri statusu mineralov smo pri dobri tretjini krav ugotovili previsoko vsebnost aP. Pri približno 5% krav smo ugotovili prenizko vsebnost aP in Ca. Na vsebnost aP in Ca lahko vpliva fiziološko obdobje, starost in prehrana krav (3). Presežek fosforja v krmi negativno vpliva na plodnost krav, v času presušitve pa vpliva na pogostejše pojavljanje obporodne hipokalcemije. Približno petina krav je imela prenizko vsebnost Na ali previsoko vsebnost K. Nizka vsebnost Na je lahko posledica pomanjkanja Na v krmi, v poletnih mesecih, ko je vroče lahko pride do povečanih izgub natrija zaradi potenja. Visoka vsebnost kalija je lahko povezana s presežkom kalija v krmi, lahko se pojavi tudi pri acidozi ali boleznih sečil (3). Dokazan je negativen učinek presežka K na presnovo Ca in Mg.

Biokemijske preiskave krvi omogočajo oceno oskrbljenosti krav z beta-karotinom iz katerega v jetrih in sluznici tankega črevesja nastaja vitamin A. Beta-karotini so tudi antioksidanti. Pomanjkanje beta-karotina vpliva na slabšo plodnost krav, pogostejše pojavljanje endometritisov in rojstvo manj vitalnih telet (5). Pri analizi rezultatov smo prenizko vsebnost beta-karotina ugotovili pri 36% krav, kar kaže na slabo oskrbo z beta-karotinom v vsaki tretji reji. Pomanjkanje beta-karotina je povezano predvsem s krmljenjem silaž slabše kakovosti.

Tabela 1: Opisna statistika preiskovanih biokemijskih parametrov

Parameter	n	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Minimum	Maksimum
CSB (g/L)	389	74,94	7,62	55,00	109,00
Alb (g/L)	180	35,17	3,20	25,30	44,30
Urea (mmol/L)	392	3,83	1,63	0,11	9,42
Ca (mmol/L)	381	2,48	0,17	1,71	3,03
aP (mmol/L)	423	2,16	0,40	0,85	3,84
Na (mmol/L)	393	142,39	3,96	131,00	155,00
K (mmol/L)	393	5,33	0,87	3,72	9,63
Cl (mmol/L)	391	100,59	3,59	89,00	114,00
Beta-karotin (mg/L)	453	5,31	2,71	0,63	14,95

Tabela 2: Odstotek vzorcev pri katerih so rezultati odstopali od referenčnih vrednosti (3, 4)

Parameter	n	Pod ref. vrednostjo (%)	Nad ref. vrednostjo (%)	Referenčne vrednosti
CSB (g/L)	389	25,2	22,6	70,0-80,0
Alb (g/L)	180	5,5	10,5	30,0-38,0
Urea (mmol/L)	392	47,9	16,8	3,60-5,50
Ca (mmol/L)	381	5,8	0,3	2,25-2,99
aP (mmol/L)	423	4,7	35,0	1,61-2,25
Na (mmol/L)	393	21,4	0,8	140-155
K (mmol/L)	393	4,1	23,1	4,2-5,8
Cl (mmol/L)	391	0,2	1,5	90-108
Beta-karotin(mg/L)	453	36,0	0	>4,0

Na ugotovljena odstopanja so poleg zdravstvenega stanja lahko vplivali tudi drugi dejavniki (prehrana). Rezultati kažejo, da so subklinične presnovne bolezni ter pomanjkljivosti v oskrbljenosti krav kar pogoste v naših čredah, zato je priporočljivo izvajati reden nadzor zlasti v rejah s težavami. S pravočasnim odkrivanjem subkliničnih presnovnih motenj in neustrezne oskrbljenosti molznic lahko ugodno vplivamo na proizvodnjo in plodnost krav ter zmanjšamo pojav kliničnih bolezni.

## Reference

1. Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 571-80.
2. Cook N, Oetzel G, Nordlund K. Modern techniques for monitoring high-producing dairy cows. 1. Principles of herd level diagnoses. In *Practice* 2006; 28: 510-15.
3. Jazbec, I. Klinično laboratorijska diagnostika. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1990: 107-65.

4. Whitaker DA. Metabolic profiles. In: Andrews AH, ed. *Bovine Medicine: Diseases and husbandry of cattle*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science, 2004: 89-107.

5. Dirksen G, Gründer H D, Stöber M. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 5<sup>th</sup> ed. Stuttgart: Parey, 2006: 1191-5.

## **Diagnostics of subclinical metabolic disorders in dairy cows**

Metabolic diseases occur most frequently in the periparturient period of cows especially during the first six weeks after calving. Metabolic diseases already in the subclinical form have a negative impact on milk yield, fertility and well-being of cows. In this study, we analysed the results of biochemical analyses of blood samples from cows from farms with fertility problems. We analysed the results of 453 cows of various breeds from 162 farms. We measured the concentration of total serum protein (TSP), albumin (Alb), urea, calcium (Ca), inorganic phosphate (iP), sodium (Na), potassium (K), chlorine (Cl), and beta-carotene. The results were compared with reference values for cows. Mean values of analysed parameters were within the reference values. In the results of individual cows were the most commonly observed deviations from the reference value in the concentration of TSP (47.8% of cows), urea (64.7% of cows), iP (39.7% of cows), K (27.2% of cows) and beta-carotene (36.0% of cows). The deviations can be influenced by various factors (health status, nutrition). According to our results, we believe that subclinical metabolic diseases are common in our herds and it would be advisable to carry out regular monitoring particular in farms with health and fertility problems.

Key words: cattle; blood; biochemistry

## PSEVDOTUBERKULOZA (KAZEozNI LIMFADENITIS)

Jože Starič\*, Matjaž Ocepek, Jasna Mićunović, Jožica Ježek, Brane Krt

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenia

joze.staric@vf.uni-lj.si

Kazeozni limfadenitis (pseudotuberkuloza) je kronična bolezen, ki jo povzroča *C. pseudotuberculosis*. Patogena je predvsem za male prežvekovalce, kjer povzroča abscese v površinskih bezgavkah in na koži (zunanja oblika) in / ali pa v notranjih organih in bezgavkah (notranja oblika). Diagnoza pseudotuberkuloze temelji na ugotavljanju prisotnosti značilnih kliničnih znakov in izolaciji bakterije. V zadnjem času se v serološki diagnostiki vse bolj uveljavlja encimskoimunski test (ELISA). Namen našega dela je bil primerjati rezultate klinične in serološke preiskave živali v dveh čredah koz, kjer je bila pseudotuberkuloza tudi bakteriološko potrjena. V čredi A je bilo pregledanih vseh 99 živali v reji, v čredi B pa je bilo od 120 živali za pregled izbranih 19 s kliničnimi znaki in 8 brez. V reji A je bilo ELISA sumljivih ali pozitivnih in klinično negativnih 50,5 % živali, ELISA negativnih s kliničnimi znamenji pa 3 %. V reji B je bilo ELISA sumljivih ali pozitivnih in klinično negativnih 18,6 % živali, ELISA negativnih s kliničnimi znamenji pa 7,4 %. Za realno oceno stanja v določeni čredi je primerno pregledati oz. testirati vse živali v reji, kjer ugotovimo tudi živali v bolj zgodnji fazi bolezni, ko še ni klinično zaznavnih abscesov in tiste, ki imajo notranjo obliko bolezni.

Ključne besede: ognojek; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; koze; mali prežvekovalci

### Uvod

Kazeozni limfadenitis ali pseudotuberkuloza je kronična bolezen, ki jo povzroča *C. pseudotuberculosis*. Ta je patogena predvsem za male prežvekovalce, kjer povzroča abscese v površinskih bezgavkah in na koži (zunanja oblika bolezni) in / ali pa v notranjih organih in bezgavkah (notranja oblika bolezni). Pri kozah je pogostejša zunanja oblika, pri kateri so prizadete najpogosteje parotidne in retrofaringealne bezgavke, pri ovcah pa notranja oblika, ki prizadene zlasti pljučne in mediastinalne bezgavke. Bolezen je opisana tudi pri drugih domačih živalih, kot so govedo, konji in prašiči, pa tudi perutnina, pojavlja pa se tudi pri divjih prežvekovalcih. Čeprav so okužbe pri ljudeh relativno redke (izpostavljeni so predvsem rejci in veterinarji), zoonotski potencial *C. pseudotuberculosis* ni zanemarljiv, saj lahko kontaminira mleko in meso, kar predstavlja tveganje tudi za potrošnike (1). Nekateri avtorji pa menijo (2), da primeri humanega limfadenitisa (vsaj v Avstraliji) niso tako redki, kot na splošno navaja literatura. Sicer pa je incidenca okužb pri ljudeh podcenjena, saj se pri bakteriološki preiskavi izolacija bakterij iz rodu *Corynebacterium* pogosto ocenjuje kot kontaminacija, čeprav je lahko glavni vzrok obolenja (3).

Bolezen se običajno zanese v čredo z nakupom okužene živali. Povzročitelj se izloča z ekskreti iz odprtih gnojnih procesov, pri procesih na pljučih pa tudi s kašljanjem oz. z nosnim izcedkom. Povzročitelj preživi v okolju 2-8 mesecev (4). Živali se največkrat inficirajo skozi poškodovano kožo (npr. pri stiženju, tetoviranju, kastraciji, skozi ranice iz



kontaminiranih jasli, poškodbah zaradi bojevanja med samci itd.), redkeje pa z inhalacijo ali peroralno. Inkubacija traja 2-3 mesece.

Diagnoza pseudotuberkuloze temelji na ugotavljanju prisotnosti značilnih kliničnih znakov in izolaciji bakterije. Abscesi se najpogosteje pojavljajo v bezgavkah na glavi in vratu, lahko pa tudi v drugih bezgavkah in so lahko do premera 5 cm. Pogosto najdemo tudi podkožne abscese na glavi, premera 1 do 2 cm. Predvsem nad kožnimi abscesi dlaka večkrat izpade. Abscesi na periferiji pogosto fistulirajo, kar povzroči nastanek ranice, ki secernira gnoj. Včasih se abscesi pojavijo tudi v vimenu. Abscesi so lahko prisotni tudi samo na notranjih bezgavkah (npr. mediastinalnih ali mezenterialnih) in organih (pljučih, vranici, ledvicah in jetrih). Take živali pogosto začnejo hirati brez jasnih kliničnih znamenj. Gnoj v abscediranih bezgavkah je lahko naložen v plasti in ima videz prerezane čebule, ni pa nujno. Na splošno je gnoj pri psevdotuberkulozi gostejše konzistence. Moške živali so zaradi načina življenja pogosteje izpostavljene infekciji in se okužijo, čeprav ni dokazov, da bi bile moške živali bolj občutljive na okužbo s *C. pseudotuberculosis*.

Bakteriološka preiskava punktata abscesov je najbolj zanesljiva diagnostična metoda. Potrebno pa se je zavedati, da punkcija predstavlja tudi tveganje za širjenje okužbe na druge živali v čredi. Poleg tega klinični znaki (povečane površinske bezgavke) niso vedno prisotni, saj so lahko prizadete le notranje bezgavke. V takih primerih, še posebno pa za diagnostiko na nivoju črede, so uporabne serološke metode, kot so sinergistična inhibicija hemolize, indirektna hemaglutinacija, reakcija vezanja komplemента, imunodifuzija in encimskoimunski test. Značilnost vseh naštetih metod je, da so relativno dobro uporabne pri kozah, manj občutljive pa so pri ovcah, še posebno pri subkliničnih primerih. Vendar pa je pri interpretaciji rezultatov seroloških metod potrebna previdnost; upoštevati je treba tudi epizootične dejavnike in zgodovino okužb v določeni čredi. V zadnjem času se v serološki diagnostiki vse bolj uveljavlja encimskoimunski test (ELISA), čeprav je ponudba komercialnih kompletov skromna, poleg tega pa je tudi njihova cena relativno visoka.

Okužene živali je potrebno čim prej izločiti iz črede. Zdravljenje se izvaja le izjemoma, pri visoko vrednih živalih, obsega pa (kirurško) obdelavo sprememb in aplikacijo antibiotikov. Mladiče je treba ločiti od okuženih mater in jih hraniti s pasteriziranim kolostrumom oz. mlekom.

Zanesljiv model preprečevanja boleznih s cepljenjem pri ovcah in kozah še ni na voljo (1), čeprav obstajajo vaccine, ločene za ovce in koze. Skupna značilnost preizkušanja različnih antigenov, adjuvantov in načinov vakcinacije je, da nudijo le delno zaščito, vendar pa je klinični potek boleznih milejši, število sprememb pa manjše. Velika previdnost je potrebna pri nakupu živali, ki morajo biti pred vhlevljenjem pregledane tako klinično (in bakteriološko) kot tudi serološko. Priporočljivo je serološko testiranje živali v izvorni čredi, če to ni možno pa karantena in 2-kratno testiranje (v razmiku 30 dni) novo nabavljenih živali.

V Sloveniji je bilo v letih 2010 in 2011 opravljeno klinično in serološko testiranje 36 tropov ovac in koz na 14 geografskih področjih (5). Serološko je bilo pozitivnih več kot 86% vseh pregledanih tropov. Največ je bilo serološko pozitivnih koz (39,7%), manj pa ovac (6,9%). Klinični znaki psevdotuberkuloze so bili prisotni v 22 od 31 pozitivnih čred, pri kozah skoraj v vseh okuženih tropih.

Namen našega dela je bil primerjati rezultate klinične in serološke preiskave živali v dveh različno velikih čredah koz, kjer je bila psevdotuberkuloza tudi bakteriološko potrjena.

## Material in metode

V čredi A je bilo klinično in serološko pregledanih vseh 99 živali v reji, v čredi B pa je bilo od približno 120 živali v čredi za pregled izbranih 27 živali, od katerih so bili pri 19 prisotni klinični znaki, pri 8 pa ne. Pri kliničnem pregledu smo pregledali vse periferne bezgavke s tipanjem in ogledovanjem. Primerjali smo bezgavke leve in desne strani telesa za boljšo oceno velikosti. Hkrati smo ugotavljali tudi prisotnost drugih patoloških procesov, ki bi jih lahko povezali s psevdotuberkulozo (otekline, brazgotine kot posledice zaceljene fistule abscesa). Pri dveh živalih iz črede A in pri eni iz črede B je bila opravljena tudi bakteriološka preiskava punktativ abscesov, pri eni iz črede A pa preiskava fibrinozno-purulentnega procesa na mediastinumu. Material smo nasadili na krvni agar. Naslednji dan smo iz tipičnih kolonij naredili razmaz (gramske pozitivne korineformne paličke) in jih determinirali s testom CAMP ter potrdili še z masnim spektrometrom (MALDI – TOF). Serološko so bile vse živali testirane z metodo ELISA (Elitest CLA, Hyphen Biomed, Francija), skladno z navodili proizvajalca. Gre za indirektni encimskoimunski test, ki je deklariran za uporabo v raziskovalne, ne pa tudi v diagnostične namene.

## Rezultati

Pri vseh štirih bakteriološko pregledanih živalih je bila izolirana bakterija *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Rezultat metode ELISA je bil sumljiv pri eni in pozitiven pri treh živalih. Ena žival od teh treh je bila klinično negativna, postmortalno pa je bila izolirana *C. pseudotuberculosis* iz fibrinozno-purulentnega procesa na mediastinumu.

V tabelah 1 in 2 so prikazani rezultati serološke in klinične preiskave za obe čredi.

Tabela 1: Rezultati preiskav v čredi A

REZULTAT	ŠTEVILO ŽIVALI	%
ELISA negativno, klinično pozitivno	3	3
ELISA sumljivo ali pozitivno, klinično negativno	50	50,5
ELISA sumljivo ali pozitivno, klinično pozitivno	22	22,2
ELISA negativno, klinično negativno	24	24,3
SKUPAJ	99	100

Tabela 2: Rezultati preiskav v čredi B

REZULTAT	ŠTEVILO ŽIVALI	%
ELISA negativno, klinično pozitivno	2	7,4
ELISA sumljivo ali pozitivno, klinično negativno	5	18,6
ELISA sumljivo ali pozitivno, klinično pozitivno	17	63
ELISA negativno, klinično negativno	3	11,1
SKUPAJ	27	100

## Razprava

Velik delež pozitivnih živali v ELISA in negativnih ob kliničnem pregledu je povsem pričakovano, saj so patološki procesi večkrat izraženi le na notranjih organih, kar je pri kliničnem pregledu težko ugotoviti. To se je ne nazadnje pokazalo tudi v našem primeru, ko smo pri klinično negativni živali ob sekciji izolirali povzročitelja bolezni. Pri kozah, ki so bile ELISA negativne in so kazale klinična znamenja bi bilo potrebno bolezen še bakteriološko potrditi z izolacijo bakterije iz punktata otekle bezgavke ali otekline. Razlike v deležih posameznih skupin živali glede na rezultate serološke in klinične preiskave so verjetno posledica izbire živali za raziskavo. V čredi A so bile namreč pregledane vse živali, medtem ko je bilo v čredi B za testiranje izbranih približno 2/3 klinično pozitivnih in 1/3 klinično negativnih živali. Za realno oceno stanja v določeni čredi je primerno pregledati oz. testirati vse živali v reji, kjer ugotovimo tudi živali v bolj zgodnjem stadiju bolezni, ko še ni klinično zaznavnih abscesov in tiste, ki imajo notranjo obliko bolezni.

## Reference

1. Lopes-Bastos B, Portella RW, Dorella FA, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunol* 2012; S4:005
2. Peel MM, Palmer GG, Stacpoole, Kerr TG. Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. *Clin Infect Dis* 1997; 24:185-91.
3. Bregenzer T, Frei R, Ohnacker H, Zimmerli W. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3(6): 696-698.
4. Washburn K. Caseous Lymphadenitis of Sheep and Goats. In: Aiello SE, eds. The Merck Veterinary Manual. Lymphadenitis and Lymphangitis (Online) Kenilworth: Merck Sharp & Dohme, 2015 [http://www.merckvetmanual.com/mvm/circulatory\\_system/lymphadenitis\\_and\\_lymphangitis/caseous\\_lymphadenitis\\_of\\_sheep\\_and\\_goats.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/circulatory_system/lymphadenitis_and_lymphangitis/caseous_lymphadenitis_of_sheep_and_goats.html) (6.5.2016)
5. Zadnik T, Grom J, Kuhar U, Adamič T, Rakuljič-Zelov S, Veternik D. Clinical and serological testing on small ruminant lentivirus and caseous lymphadenitis infection in goats and sheep flocks in Slovenia. In: XIII Middle European Buiatrics Congress, Belgrade, Serbia, 5-8 June, 2013. 2013 pp.563-567.

## Pseudotuberculosis (Caseous lymphadenitis)

Caseous lymphadenitis (pseudotuberculosis) is a chronic disease caused by *C. pseudotuberculosis*. It affects mainly small ruminants, where it causes abscesses in the superficial lymph nodes and skin, or/and in the internal organs and lymph nodes. The diagnosis is based on presence of clinical signs and isolation of bacteria. Serological diagnosis is also possible. The purpose of the study was to compare results of clinical and serological testing of animals in two goat flocks, where pseudotuberculosis was confirmed bacteriologically. In flock A all 99 animals were included in the study and in flock B 19 selected animals with clinical signs and 8 without were included out of 120 animals. In flock A 50.5 % of animals were ELISA suspicious or positive and clinically negative, and 3 % were ELISA negative with clinical signs. In flock B 18.6 % of animals were ELISA suspicious or positive and without clinical signs, ELISA negative with clinical signs were 7.4

---

% of examined goats. For a realistic assessment of the situation in a flock, it is appropriate to test all animals. This enables detection of animals in more early stage when clinically detectable abscesses are not present yet and those which have the internal form of the disease.

Key words: abscess; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; goat; small ruminants

# DVE LETI IZVAJANJA PROSTOVOLJNEGA PROGRAMA ZA PRIZNANJE STATUSA ČREDA PROSTA BVD V SLOVENIJI

Ivan Toplak\*, Peter Hostnik, Jože Grom

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Od konca leta 2013 je v veljavi nov pravilnik, ki na prostovoljnem pristopu rejcem govedu v Sloveniji prvič omogoča, da uradno dobijo priznanje statusa čreda prosta BVD. V začetku leta 2016 je imelo priznan status 20 govejih čred, še več pa jih je v postopku pridobivanja statusa, kar potrjuje, da so rejci program sprejeli. V letih od 2013 do 2016 smo za potrebe pridobivanja statusa laboratorijsko na prisotnost protiteles pregledali 3.747 vzorcev serumov v testu ELISA in 7.325 vzorcev na prisotnost virusa BVD z metodo RT-PCR. To je sicer vzpodbudno, vendar je v prostovoljni program še vedno vključen le nizek odstotek govejih rej. Ker pa je v Sloveniji še vedno več kot polovica govejih čred neokuženih, bi lahko vsaka od teh rej uradno dobila priznanje statusa čreda prosta BVD že v roku šestih mesecev. Že sedaj je jasno, da le s prostovoljnim programom ne bomo dosegli bistvenega napredka, zato je potrebno čim prej pristopiti k sprejetju nacionalnega programa izkoreninjenja BVD.

Ključne besede: bovina virusna diareja; prostovoljni program; izkoreninjenje; diagnostika; govedo

## Uvod

V Sloveniji spremljamo bolezen BVD pri govedu od leta 1994 naprej, z virusom pa je okuženih približno ena tretjina govejih rej, v okrog polovici slovenskih rej pa se nahajajo vsaj posamezne živali, ki so pozitivne na protitelesa proti virusu BVD (1). Do leta 2016 smo slovenskih rejah ugotavljali kroženje šestih različnih podtipov virusov BVD, ki se že več desetletij prenašajo med rejami znotraj Slovenije, občasno pa se v naše reje, z uvozom okuženih živali, vnesejo še novi sevi BVD (2). Od konca leta 2013 je v veljavi nov pravilnik (Ur. list RS št. 107/13), ki na prostovoljnem pristopu rejcem govedu v Sloveniji prvič omogoča, da dobijo uradno priznanje statusa čreda prosta BVD, za okužene reje pa omogoča postopek pridobitve statusa. Status se podeli na podlagi dveh zaporednih negativnih rezultatov v razmiku 6 mesecev na prisotnost protiteles pri živalih v starostni skupini 7 do 13 mesecev (3). Ta status lahko potem reja vsako leto obnovi. Če je v reji virus BVD prisoten, lahko rejo hitro pozdravimo tako, da v reji identificiramo vse nosilke virusa BVD, jih izločimo in s tem preprečimo nadaljnjo ohranjanje ter kroženje virusa BVD znotraj reje. V dveh letih po začetku izvajanja programa so sicer številne reje dobile status, vendar je to le nizek odstotek od vseh rej, zato je potrebno razmisliti, kako v prihodnje pritegniti v program večje število rej.

## Material in metode

Program za pridobitev statusa čreda prosta BVD se izvaja na podlagi sprejetega pravilnika (Ur. list RS št. 107/13), ki se za rejce govedu izvaja na prostovoljni osnovi. Veterinarji v rejah odvzemajo serumske vzorce za potrebe:

1. priznanja statusa (dvakraten pregled vseh živali v starostni skupini 7-13 mesecev na prisotnost protiteles v razmiku 6 mesecev),
2. pridobitve statusa (pregled vseh živali v reji na prisotnost virusa BVD in v nadaljevanju pregled vseh novorojenih telet na prisotnost virusa v obdobju enega leta od izločitve zadnjega izločevalca virusa),
3. vzdrževanja (enkrat letno pregled vseh živali v starostni skupini 7-13 mesecev na prisotnost protiteles).

Dokazovanje protiteles proti virusu BVD smo v vzorcih odvzetih serumov živali izvajali s komercialnim testom ELISA (Svanovir® BVD Ab, Švedska) po navodilih proizvajalca, dokazovanje nukleinske kisline virusa BVD pa z metodo RT-PCR (4). Obe metodi sta v našem laboratoriju akreditirani.

## Rezultati

V letih od 2013 do 2016 smo za potrebe priznanja, pridobivanja in vzdrževanja statusa laboratorijsko pregledali 3.747 vzorcev serumov v testu ELISA na prisotnost protiteles. Občasno ugotavljamo, da je posamezna žival iz starostne skupine 7-13 mesecev reagirala pozitivno na protitelesa v starosti 7 ali celo 8 mesecev. V tem primeru smo rejcu priporočili odvzem vzorca ponovno čez en mesec, da izključimo prisotnost kolostralnih protiteles.

V obdobju od leta 2013 do 2016 smo za potrebe pridobivanja statusa pregledali 7.325 vzorcev z metodo RT-PCR na prisotnost virusa BVD. Od leta 2014 naprej se je število rej s statusom nenehno povečevalo, v januarju 2016 je imelo uradni status čreda prosta BVD priznано že 20 govejih čred v Sloveniji.

## Razprava

Modificiran "Skandinavski model", ki temelji na testiranju skupine živali v reji na prisotnost protiteles in ugotavljanju ter odstranjevanju perzistentnih izločevalcev virusa (PI) iz okužene reje, smo prenesli v letu 2013 v sprejet pravilnik v Sloveniji. Model temelji na ne-vakcinalnem pristopu, laboratorijskem testiranju rej in izvajanju preventivnih ukrepov. Rejcem 20. govejih čred je že uspelo pridobiti priznanje statusa in vsi ti so javno dostopni na spletni strani Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Prav gotovo je to velik napredek, glede na prejšnja leta, vendar ugotavljamo, da je še vedno zavedanje rejcev o pomenu statusa čreda prosta BVD na nizki ravni. Polovica slovenskih rej bi lahko pridobila status v pol leta. Zakaj tega ne izkoristi več rejcev, ni popolnoma jasno. Problemov v zvezi z kontrolo in izkoreninjenjem BVD je več vrst in pred nami je, da jih uspešno rešimo. Prav gotovo je eden večjih problemov ta, da laboratorijsko ugotovljeni PI virusa BVD niso takoj označeni s certifikatom "nosilec PI virusa BVD" in poslani v klavnico. Živali v prometu niso pod kontrolo in še vedno uvažamo veliko število živih – nepregledanih živali. Prav tako so nekatere živali še vedno zavestno ali naključno cepljene proti virusu BVD. Določen problem predstavlja tudi skupna paša. Nekateri rejci s priznanim statusom imajo zato pri vzdrževanju statusa občasno težave, če se pri testiranju ugotovi eno seropozitivno žival, status izgubijo. To bi bilo potrebno v pravilniku spremeniti tako,

da se reji omogoči vzdrževanje statusa. Izkušnje vseh evropskih držav s prostovoljnimi programi so "negativne", države pa so izkoreninjenje na nacionalni ravni dosegle šele, ko je vsak ugotovljen primer BVD bilo potrebno obvezno prijaviti. Predlogi, da bi v naslednjem obdobju v program priznanja obvezno zajeli vse reje bikovskih mater so v pravi smeri, o dejanskem ekonomskem napredku za rejce in govedorejo pa bomo lahko govorili šele, ko bo sprejeta odločitev o obveznem nacionalnem programu izkoreninjenja BVD. Tega so uspešno izvedle in zaključile že številne države v naši bližji sosesčini in lahko se zgodi, da bomo zaradi "cepetanja na mestu" v nekaj letih ostali okužen otok sredi Evrope.

## Reference

1. Grom J, Barlič-Maganja. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections - control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol* 1999; 2: 259-264.
2. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi: doktorska disertacija. 2004.
3. Pravilnik o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste goveje virusne diareje, Uradni list RS, št. 107/13.
4. Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Mrkun J. The usefulness of two molecular methods for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea using oral swab samples. *Slov Vet Res* 2015; 52: 23-30.

## Two years of implementation of voluntary program for recognition of status herd free of BVDV in Slovenia

Since the end of 2013 the new policy regarding BVD is implemented in Slovenia. For the first time cattle breeders can apply on a voluntary basis for the official recognition a BVDV free herd status. At the beginning of 2016 the status have already been recognized for 20 bovine herds and much more are in the process of obtaining status, which confirms that the farmers adopt the program. Between the years 2013 and 2016 for the purpose of obtaining the status 3.747 serum samples were laboratory tested by ELISA for the presence of antibodies against BVD and 7.325 samples by the RT-PCR method for the detection of BVD virus. Although this is encouraging, still only a small percentage of breeders is involved in the voluntary program. However, since more than half of bovine herds in Slovenia are still uninfected, each of these breeders might officially gained recognition of BVD free herd within six months. It is already clear, that only with the voluntary program we will not achieve substantial progress, so it is necessary, as soon as possible, to confirm and adopt a national eradication program for BVD.

Keywords: bovine viral diarrhoea virus; voluntary program; eradication; diagnostics; cattle

# GENOTIPI GENA ZA PRIONSKI PROTEIN PRI OVCAH Z ATIPIČNIM PRASKAVCEM V SLOVENIJI

Jelka Zabavnik Piano<sup>1\*</sup>, Marko Cotman<sup>1</sup>, Ivan Ambrožič<sup>2</sup>, Polona Juntos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, <sup>2</sup>Sektor za hrano, krmo in zdravila, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, <sup>3</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jelka.zabavnik@vf.uni-lj.si

Atipični praskavec je oblika prenosljive spongiformne encefalopatije (TSE), ki se pojavlja v večini evropskih držav in predstavlja vedno večji delež ugotovljenih primerov praskavca pri ovcah. V Sloveniji je bil atipični praskavec pri ovcah prvič ugotovljen leta 2010, po uvedbi metode, ki je bila dovolj občutljiva, da je zaznala prione, ki so značilni za atipični praskavec. Od začetka leta 2010 do marca 2016 smo na TSE testirali 8633 ovac in potrdili 10 primerov atipičnega praskavca. Dovzetnost na klasično in atipično obliko praskavca je, vsaj deloma, genetsko pogojena. Znano je, da so ovce z genotipom gena za prionski protein (*Prnp*) ARR/ARR najbolj odporne na razvoj klasične oblike praskavca, ovce z genotipom VRQ/VRQ so najbolj dovzetne. Obratno se atipični praskavec pogosto pojavlja pri ovcah, ki imajo alel ARR in le redko pri ovcah z alelom VRQ, na razvoj bolezni pa pomembno vpliva tudi aminokislina na položaju 141 prionskega proteina (fenilalanin ali levicin). Primerjava genotipov ovac z atipičnim praskavcem z ugotovljenimi genotipi 1680 naključno izbranih poginulih ovac je pokazala, da se atipični praskavec ne pojavlja pri ovcah z aleli VLRQ in ALRH. Ugotovljen je bil pri ovcah z alelom AFRQ, čeprav je v Sloveniji delež ovac s tem alelom majhen (1,14 % vzorca ovac), in pri ovcah z alelom ALHQ ter le pri manjšem deležu ovac z alelom ALRR in ALRQ. Alel ALHQ se v Sloveniji pojavlja pri 6,5 % ovac, zato lahko pričakujemo, da se bo atipični praskavec še pojavljal v naši populaciji ovac.

Ključne besede: prenosljive spongiformne encefalopatije; atipični praskavec; genotip; gen za prionski protein

## Uvod

Praskavec je bolezen drobnice, ki spada v skupino neozdravljivih prenosljivih spongiformnih encefalopatij (TSE) ali prionskih bolezni, pri katerih nastajajo v celicah spremenjeni patološki prionski proteini - prioni (PrP<sup>Sc</sup>), se v njih kopičijo in povzročajo značilne spremembe v živčnem sistemu (1). Prionske bolezni so infektivne, sporadične in/ali dedno pogojene (3). Klasična oblika praskavca je tipični predstavnik prionske bolezni, potrebna je infekcija s PrP<sup>Sc</sup>, na dovzetnost pa pomembno vpliva genotip *Prnp*. Klasični praskavec se pojavlja pri drobnici v Evropi že več kot dve stoletji. Atipični praskavec je bil prvič ugotovljen leta 1998 na Norveškem in ga poznamo kot Nor98 (2), sedaj ga ugotavljajo v večini evropskih držav in zaradi uspešnega zatiranja klasičnega praskavca predstavlja vedno večji delež primerov praskavca pri ovcah (2, 3). Etiološki dejavniki pri razvoju atipičnega praskavca še niso popolnoma raziskani. Gre za sporadično, verjetno spontano obliko bolezni, na katero tudi vpliva oblika genotipa *Prnp*. Ugotovljen je vpliv aminokislina



fenilalanina (F) na položaju 141 prionskega proteina, ki je pogost pri ovcah z atipičnim praskavcem. Atipični praskavec se pogosto pojavlja pri ovcah, ki imajo alel ARR in AHQ in le redko pri ovcah z alelom VRQ (2, 3, 4).

Poznavanje genotipov lahko omogoča predvidevanje pojava atipičnega praskavca, zato smo v naši študiji želeli ugotoviti genotipe *Prnp* pri ovcah v Sloveniji in jih primerjati z genotipi ovc, kjer je bil ugotovljen atipični praskavec.

## Material in metode

Za izolacijo DNK in določanje genotipa *Prnp* na kodonih 136, 141, 154 in 171 smo uporabljali vzorce mišic ovac, ki smo jih pobrali iz dveh skupin poginjenih ovac: 1) Ovce po programu monitoringa, ki je bil predpisan in financiran z letno odredbo Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in se je izvajal od leta 2009. Te vzorce mišic se je izbiralo naključno pri poginulih ovcah, vzorce so odvzeli patologi Nacionalnega veterinarskega inštituta, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani (VF, UL). Letni monitoring je zajemal od 100 do 130 živali, skupaj smo od leta 2009 določili genotip pri 1680 naključno izbranih poginjenih ovcah; 2) Vzorce mišic ovac, ki so v hitrem postmortalnem testu z ELISA metodo HerdChek BSE Scrapie Antigen (IDEXX Laboratories) reagirale pozitivno na TSE in smo jih prejeli iz Laboratorija za patologijo in TSE, VF, UL. Od začetka leta 2010 do konca marca 2016 smo določili genotip pri 16 ovcah, ki so bile sumljive na TSE, pri desetih med njimi (10/16) pa je bil potrjen atipični praskavec (od 8633 na TSE pregledanih vzorcev).

Pri vseh vzorcih smo standardno odvzeli vzorec zunanje žvekevke (maseter), ki smo jo s skalpelom razrezali na majhne koščke in jih homogenizirali v pufru s homogenizatorjem Fasth (ConsulTH). Iz približno 3 mm<sup>3</sup> mišičnega tkiva smo izolirali genomsko DNA z reagentom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Genotipe smo določali s testom ločevanja alelov z verižno reakcijo v realnem času. Reakcijo smo izvajali v petih epruvetah (po ena epruveta za allele na položajih 136, 141, 154 in dve epruveti za položaj 171) z reagenti Taqman Genotyping Master Mix or Taqman Universal Master Mix – Applied Biosystems) na aparaturi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

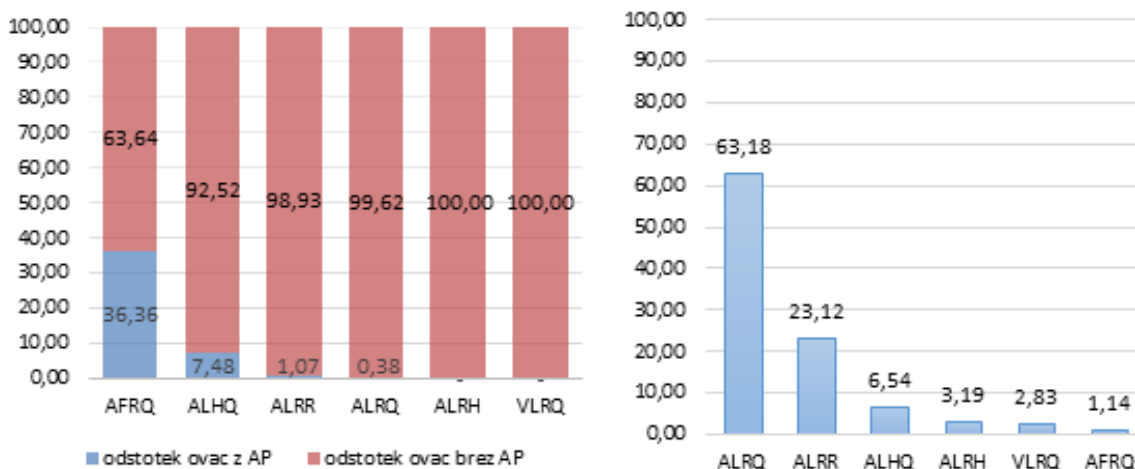
## Rezultati

Prevalenca atipičnega praskavca v Sloveniji je 0,001. Rezultati monitoringa kažejo, da se v populaciji ovac v Sloveniji najpogosteje pojavlja alel ALRQ. Najnižja je frekvenca alela AFRQ, ki je bil ugotovljen v 1,14 % od vseh preiskovanih ovac skozi vsa leta. Odstotki posameznih alelov se skozi leta ohranjajo. Slika 1 prikazuje odstotke posameznih alelov *Prnp*. Prikazan je tudi odstotek ovac z atipičnim praskavcem znotraj posameznega alela. Razvidno je, da za atipičnim praskavcem najpogosteje obolevajo živali z alelom AFRQ in/ali ALHQ.

Vse ovce z atipičnim praskavcem, razen ene, za katero nimamo podatka o pasmi, so bile jezersko-solčavske pasme ali križane s to pasmo. Vse obolele ovce so bile starejše od 4 let (do 10 let).

## Razprava

Genotipi ovac, ki vsebujejo alel AFRQ so visoko dovzetni na atipični praskavec (1, 2, 3, 4), kar se, kljub nizki frekvenci alela AFRQ v naši populaciji ovac, kaže tudi v naši študiji. Čeprav je v populaciji ovac prisotnih le 1,14 % alela AFRQ, imajo tri ovce z atipičnim



Slika 1: Odstotek ovac z atipičnim praskavcem in odstotek ovac brez praskavca znotraj posameznega alela *Prnp*, določenega pri monitoringu genotipov naključno izbranih poginulih ovac (levo). Odstotek posameznih alelov *Prnp*, ugotovljen pri monitoringu genotipov (desno) (n = 1680) (AP – atipični praskavec)

praskavcem od desetih vsaj en alel AFRQ (1 x AFRQ/AFRQ in 2 x v heterozigotni obliki). Pri sedmih ovcah z atipičnim praskavcem smo določili alel ALHQ vsaj v eni kopiji (1 x ALHQ/ALHQ in 6 x v heterozigotni obliki). Alel ALHQ se glede na podatke, pridobljene pri monitoringu alelov pri poginulih ovcah v Sloveniji, pojavlja pri 6,5 % ovac, zato lahko pričakujemo, da se bo atipični praskavec še pojavljal v naši populaciji ovc.

Na dovzetnost na praskavec vpliva tudi pasma ovac (4), iz pregleda pasem, kjer se pojavlja atipični praskavec, lahko sklepamo, da je jezersko-solčavska pasma dovzetna za to obliko prionske bolezni.

## Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo Magdaleni Dobravec za odlično tehnično pomoč pri izvedbi določanja genotipov. Določanje genotipizacije *Prnp* pri ovcah je bilo izvedeno pod okriljem Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

## Reference

1. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 13363-83.
2. Benestad SL, Sarradin P, THU b, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and the designation of a new type, Nor98. Vet Rec 2003; 153: 202-8.
3. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. EFSA Journal 2014;12:3781, 155.
4. Benestad SL, Arzac JN, Goldmann W, Nöremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Vet Res 2008; 39:19.
5. Zabavnik Piano J, Cotman M, Pogačnik M, Juntos P. Scrapie-susceptibility-linked polymorphisms of the prion protein gene in Istrian Pramenka sheep. Slov vet res 2004; 41: 83-8.

## Genotypes of prion protein gene in sheep with atypical scrapie in Slovenia

Atypical scrapie is a form of transmissible spongiform encephalopathy (TSE). It is observed in most European countries and represents a growing proportion of detected scrapie cases in sheep. Ovine atypical scrapie was established in Slovenia for the first time in 2010 after introduction of the test that was sensitive enough to detect the form of prions characteristic for atypical scrapie. From the beginning of 2010 to the end of March 2016 we tested for scrapie 8633 sheep and confirmed 10 cases of atypical scrapie. Susceptibility to classical and atypical form of scrapie is at least partly genetically determined. It is known that sheep with the prion protein gene (*Prnp*) genotype ARR/ARR are the most resistant to the development of classical form of scrapie, the sheep with the genotype VRQ/VRQ are the most susceptible. Conversely, atypical scrapie often occurs in sheep with ARR allele and rarely in sheep carrying the VRQ allele. In addition, development of the disease is significantly affected by the amino acid at position 141 of the prion protein (phenylalanine or leucine). Comparison of *Prnp* genotypes of sheep with atypical scrapie to genotypes of 1,680 randomly selected dead sheep showed that atypical scrapie does not occur in sheep carrying alleles VLRQ and ALRH. It was detected in sheep with allele AFRQ, although in Slovenia proportion of ewes with this allele is small (1.14% of the sample of sheep) and in animals with allele ALHQ. Only a small proportion of diseased sheep had allele ALRR and ALRQ. Allele ALHQ in Slovenia occurs in 6.5% of sheep, so we can expect that the atypical scrapie would occur in our sheep population.

**Key words:** transmissible spongiform encephalopathies; atypical scrapie; genotype; prion protein gene

# DOLOČITEV PREVALENCE PERZISTENTNIH IZLOČEVALCEV VIRUSA BVD IZ RUTINSKO TESTIRANIH SERUMSKIH VZORCEV

Tina Žitnik Oitzl, Danijela Rihtarič, Ivan Toplak\*

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V raziskavo smo vključili rutinske serumske vzorce goveda, ki smo jih v laboratorij prejeli od začetka leta 2010 do aprila 2016. V priskovanih vzorcih smo s klasično metodo verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) dokazovali prisotnost nukleinske kisline virusa bovine virusne diareje (BVD). Skupno smo pregledali 12.008 vzorcev in prisotnost virusa BVD dokazali v 1,32% vzorcev, najnižji odstotek pozitivnih vzorcev smo ugotovili leta 2011 (0,42%), najvišjega pa leta 2015 (1,81%). Največ pozitivnih živali smo ugotovili v starostni skupini do 6 mesecev (56,60%), sledi starostna skupina od 6 do 24 mesecev (13,84%) ter starejše od 24 mesecev (8,81%). Ugotavljamo, da vsako leto pregledamo večje število vzorcev, prevsem po letu 2013, ko je bil v Sloveniji uveden prostovoljni program za priznanje statusa črede, proste BVD. V čredah, kjer je bolezen BVD prisotna, je ključna ugotovitev in izločitev vseh perzistentnih izločevalcev (PI) iz reje. Tako preprečimo nadaljno kroženje virusa in rejo pozdravimo.

Ključne besede: virus bovine virusne diareje; perzistentni izločevalec virusa; diagnostika; prevalenca

## Uvod

Bovina virusna diareja je bolezen, ki povzroča velike ekonomske škode. Virus BVD spada v družino *Flaviviridae* in je soroden virusu klasične prašičje kuge in virusu borderske bolezni (1). Viruse BVD razvrščamo v genotipe 1, 2, in 3 (1), v Sloveniji smo dokazali le viruse genotipa 1 (2). Virus BVD je razširjen predvsem pri govedu, lahko pa se okužijo tudi ovce, koze in prašiči. Okužba reje se kaže s povišano telesno temperaturo, drisko, padcem mlečnosti, respiratornimi težavami in imunosupresijo. Virus pri kravah povzroča neplodnost in pregonitve, prehaja skozi placento in povzroča abortuse, anomalije telet in rojstvo nevitarnih telet (1). Če se krava okuži med 30. in 125. dnevem brejosti (3), zaradi vzpostavljanja imunokompetence v tem starostnem obdobju, imunski sistem teleta virusa ne prepozna kot tujka, kar ima za posledico rojstvo klinično zdravega teleta, ki je perzistentni izločevalec (PI). PI so večinoma mlajše živali in so glavni rezervoar virusa v okuženi reji, izločajo ga v urinu, fecesu, izcedkih, mleku in semenu (1). Ključno pri kontroli in zdravljenju bolezni je odkrivanje in izločitev PI. Te živali so klinično zdrave ali slabše priraščajo, kasneje pa lahko razvijejo mukozno bolezen (1). Prevalenca PI v okuženih državah znaša med 0,3 in 2,6% (3). V Sloveniji prevalenca virusa na večjem številu testiranih vzorcev ni bila določena še v nobeni raziskavi.

## Material in metode

Od začetka leta 2010 do aprila 2016 smo na prisotnost virusa BVD pregledali preko 12 tisoč serumskih vzorcev goveda. Izolacijo nukleinskih kislin smo izvedli s QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). S klasično metodo PCR OneStep RTPCR kit (Qiagen, Nemčija) smo pomnožili odsek virusnega genoma v 5'nekodirajoči regiji v dolžini 300 nukleotidov. Produkte PCR smo analizirali z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu in pri pozitivnih vzorcih dokazali produkt specifične velikosti 300 bp. S postopkom uspešno dokazujemo viruse BVD iz genotipa 1 in 2. Metoda je akreditirana po ISO 17025.

## Rezultati

Od 12.008 pregledanih vzorcev v letih od 2010 do 2016 smo virus BVD dokazali pri 159 (1,32 %) vzorcih živali. Najnižji odstotek pozitivnih vzorcev smo ugotovili leta 2011 (0,42%), najvišji pa leta 2015 (1,81%). Pozitivne živali smo razdelili v tri starostne kategorije. Največ, 90 vzorcev pozitivnih živali, je bilo ugotovljenih v starostni skupini do 6 mesecev (56,60 %), v starostni skupini od 6 do 24 mesecev je bilo 22 pozitivnih (13,84%) in nad 24 mesecev 14 pozitivnih (8,81%) živali (tabela 1).

Tabela 1: Ugotovljena prevalenca pozitivnih živali na prisotnost virusa BVD v letih od 2010 do 2016, s prikazom treh starostnih kategorij pozitivnih živali (do 6 mesecev, od 6 do 24 in nad 24 mesecev)

Leto	Št. test. živali	Št. poz. živali	Št. neg. živali	% pozitivnih	Starost pozitivnih živali			
					do 6 M	od 6 do 24 M	nad 24 M	ni podatka
2010	983	10	973	1,02%	0	4	0	6
2011	954	4	950	0,42%	1	0	0	3
2012	1.061	13	1.048	1,23%	5	2	1	5
2013	2.379	27	2.352	1,13%	19	0	0	8
2014	2.792	50	2.742	1,79%	35	8	5	2
2015	2.039	37	2.002	1,81%	21	6	4	6
2016 <sup>#</sup>	1.800	18	1.782	1,00%	9	2	4	3
Skupaj	12.008	159	11.849	1,32%	90	22	14	33
Odstotek pozitivnih živali po kategorijah					56,60%	13,84%	8,81%	20,75%

## Razprava

Ugotovili smo, da je povprečna prevalenca PI živali od leta 2010 do aprila 2016 v Sloveniji znašala 1,32%. Število pregledanih rej in vzorcev se iz leta v leto povečuje, predvsem je zaznavna rast števila testiranih vzorcev leta 2014, ko je zaživel program za priznanje statusa črede, proste BVD, v katerega se rejci vključujejo prostovoljno. Odstotek pozitivnih vzorcev je bil najvišji leta 2014 (1,79%) in leta 2015 (1,81%), prav gotovo zaradi ugotavljanja in izločanja PI virusa BVD iz pozitivnih rej. V pozitivnih rejah je potrebno le enkrat pregledati vse živali na prisotnost virusa BVD, da bi ugotovili vse PI in jih takoj izločili v klanje. Po izločivi vseh PI živali iz okužene reje se uspešnost kontrolira s testiranjem živali na prisotnost protiteles v starostni kategoriji od 7 do 13 mesecev. Ugotovljena prevalenca pozitivnih živali

na virus BVD je še nižja, če upoštevamo, da so nekatere pozitivne živali lahko bile v času pregleda v akutni fazi bolezni. Ta podatek je zelo spodbuden za rejce, da se odločijo za pridobitev in priznanje statusa črede, proste BVD, do katerega pridejo v Sloveniji z izločitvijo vseh PI, kar v povprečju znaša od 1 do 2% celotnega staleža živali v reji.

## Reference

1. OIE: Manual of Diagnostic Tests And Vaccines for Terrestrial Animals 2015. Chapter 2.4.8. Bovine Viral Diarrhoea.
2. Toplak I, Hostnik P, Rihtarič D, Grom J. The voluntary programme for control and eradication of bovine viral diarrhoea virus infection in Slovenia. First International Symposium of Veterinary Medicine - ISVM 2015. Novi Sad: 2015: 36-41.
3. Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995; 11(3): 425–45.

## Determination of the prevalence of persistently infected animals with BVDV from routine tested serum samples

In this study we analyzed cattle serum samples which were delivered into laboratory from beginning of 2010 until April 2016. We detected nucleic acid of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with conventional polymerase chain reaction (RTPCR). Altogether we have analyzed 12.008 samples and BVDV was detected in 1,32% of samples. The lowest percent was in year 2011 (0,42%) and the highest in 2015 (1,81%). The highest number of positive animals were detected in the age group until 6 months (56,60%), followed by the age group between 6 to 24 months (13,84%) and older than 24 months (8,81 %). We found out that the number of analyzed samples is increasing each year, particularly after 2013, when the voluntary program for control and eradication of bovine viral diarrhoea virus infection was introduced in Slovenia. In herds where BVDV is present identification and elimination of all persistently infected (PI) animals is the key element for eradication and healing of the herd.

Key words: bovine viral diarrhoea virus; persistently infected animal; diagnostics; prevalence



---

**Prašiči**

Pigs



# SPREMEMBE V SLOVENSKI PRAŠIČEREJI PO VSTOPU V EVROPSKO UNIJO

Marina Štukelj

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

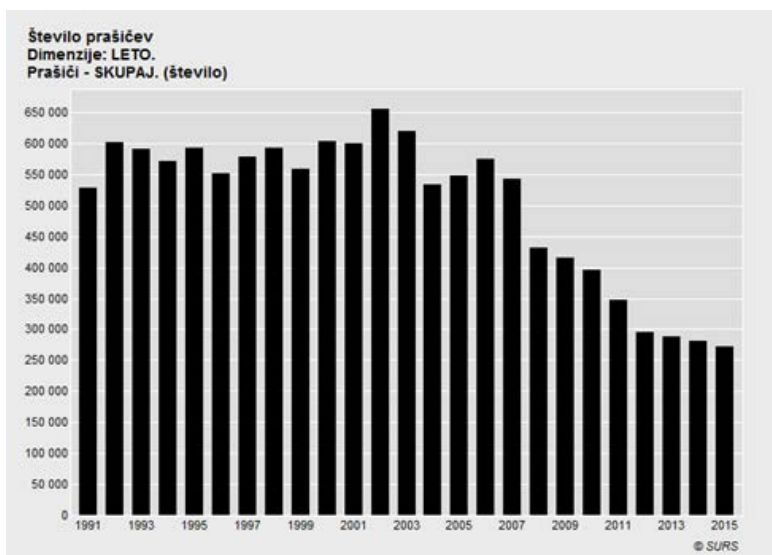
marina.stukelj@vf.uni-lj.si

Stanje v slovenski prašičereji lahko razdelimo na dve obdobji; pred vstopom v Evropsko unijo (EU) in po njem. Leta 2002 smo imeli 655.663 prašičev, leta 2015 le še 271.385. Do vstopa v EU smo spremljali zdravstveno stanje prašičev v okviru letnih Odredb glede prisotnosti protiteles proti Aujeszkijski bolezni (AB), klasični prašičji kugi (KPK), brucelozi, virusnem vnetju želodca in črevesja prašičev (TGE), prašičjem respiratornem korana virusu, leptospirozi in prašičjemu reprodukcijskemu in respiratornemu sindromu (PRRS). Poleg omenjenih bolezni smo pregledovali prašiče tudi glede prisotnosti protiteles proti enzootski pnevmoniji, aktinobacilarni plevropnevmoniji, salmonelozi, prašičjemu parvovirusu, prašičjemu cirkovirusu tipa 2, prašičji influenci. Pred letom 2004 nismo dokazali: PRRS, TGE, AB, KPK, vezikularne bolezni prašičev, prašičje dizenterije, bruceloze, klostridijskega enteritisa, prevalenca salmoneloze in leptospiroze je bila nizka. K dobremu zdravstvenemu stanju je bistveno pripomogla obvezna karantena za vse uvožene prašiče.

V okviru Odredbe letos pregledujemo vzorce glede prisotnosti protiteles proti AB in glede prisotnosti virusa klasične in afriške prašičje kuge. Tako o zdravstvenem stanju naših prašičev nimamo skoraj nobenih podatkov več. Po vstopu v EU smo si vnesli PRRS, prašičjo dizenterijo, klostridijski enteritis in prašičjo epidemično drisko. Zaradi prostega trgovanja s prašiči in neizvajanja biovarnostnih ukrepov, je velika nevarnost širjenja patogenih mikrobov v Slovenijo.

**Ključne besede:** prašiči; stalež; zdravstveni status

Stanje v slovenski prašičereji lahko razdelimo na dve obdobji; pred vstopom Slovenije v Evropsko unijo (EU) in po njem. Leta 2002 smo v Sloveniji imeli največji stalež prašičev (655.663), leta 2004 je stalež že padel na 533.998 prašičev. Zadnji podatki so iz leta 2015, ko smo imeli le še 271.385 prašičev (statistični urad RS). Pred vstopom Slovenije v EU smo imeli 9 velikih farm prašičev, nato se je število iz leta v leto nižalo. Trenutno imamo le še tri velike farme. Dve farmi imata vse proizvodne faze na isti lokaciji. Pomeni proizvodnjo od prasiatve do pitanja oz. kombinacijo s pitanjem v kooperacijskih rejah. Tretja farma pa ima ločeni proizvodni fazi; na eni lokaciji imajo proizvodnjo od prasiatve do odstavitve, na drugi pa pitance. Večina naših rej je malih rej, ki imajo od 1 do 20 plemenskih prašičev. Takšnih rej je 3909 od skupaj 4162. Poleg tega imajo te reje v glavnem vse proizvodne faze na isti lokaciji.



Graf 1: Stalež prašičev od leta 1991 do 2015 (vir: SURS, [http://pxweb.stat.si/pxweb/igraph/MakeGraph.asp?onpx=y&pxfile=1517402S201641844716.px&PLanguage=2&menu=y&gr\\_type=1](http://pxweb.stat.si/pxweb/igraph/MakeGraph.asp?onpx=y&pxfile=1517402S201641844716.px&PLanguage=2&menu=y&gr_type=1))

Do vstopa Slovenije v EU smo redno spremljali zdravstveno stanje prašičev glede prisotnosti protiteles proti Aujeszzkijevi bolezni (AB), klasični prašičji kugi (KPK), brucelozni, virusnem vnetju želodca in črevesja prašičev (transmisibilni gastroenteritis - TGE), prašičjem respiratornem korana virusu (PRCV), leptospirozi in prašičjemu reprodukcijskemu in respiratornemu sindromu (PRRS). Te bolezni smo spremljali v okviru letne Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali. Poleg omenjenih predpisanih bolezni smo pregledovali prašiče tudi glede prisotnosti protiteles proti enzooski pnevmoniji (mikoplazemski pljučnici), aktinobacilarni plevropnevmoniji, salmonelozni, prašičjem parvovirusu, prašičjem cirkovirusu tipa 2, prašičji influenci. Tako smo pred vstopom v EU imeli ugodno zdravstveno stanje naših prašičev. Pred letom 2004 nismo dokazali protiteles proti PRRS, TGE (samo pri posameznih prašičih - single ton reactors), AB, KPK, vezikularni bolezni prašičev, prašičji dizenteriji, brucelozni, klostridijskem enteritisu pujskov, prevalenca salmonelozne in leptospiroze pa je bila zelo nizka (1, 2). Zelo pogoste pa so bile že pred vstopom v EU: mikoplazemska pljučnica, atrofični rinitis in bolezenski sindromi povezani s cirko virusom tipa 2. K dobremu zdravstvenemu stanju je poleg omenjenih pregledov bistveno pripomogla obvezna 30- dnevna karantena za vse uvožene prašiče. V karantenah se je vzorčilo dvakrat, ob začetku in koncu karantene. Vzorci so se pregledovali na: PRRS, TGE, AB, KPK, slinavko in parkljevko, brucelozo, leptospirozo, prašičjo dizenterijo in klostridijski enteritis. Poleg omenjenega se je izvedel tudi intra-dermalni tuberkulinski test. Zaradi stroškov karantene se je v glavnem trgovalo znotraj države, kar je še dodatno pripomoglo k dobremu zdravstvenemu stanju prašičev (1,2).

Po vstopu Slovenije v EU smo si pridobili status države uradno proste bolezni Aujeszkega. Zato se predpisan monitoring v okviru letne Odredbe izvaja zgolj za vzdrževanje tega statusa. Poleg omenjenega se pregleduje v okviru Odredbe samo še en odstotek poginjenih prašičev glede prisotnosti virusa klasične in afriške prašičje kuge. Tako o zdravstvenem stanju naših prašičev nimamo skoraj nobenih podatkov več. Z ukinitvijo obveznih karanten je prišlo do prostega pretoka prašičev. Rejci ne poznajo zdravstvenega statusa svoje reje, prav tako ne kupujejo preverjeno negativnih prašičev glede nekaterih bolezni in prašiče pripeljejo v rejo brez predhodne karantene. Znano je, da se bolezen vnese v rejo najpogosteje z živimi

prašiči. V Sloveniji imamo v glavnem male reje, ki so navadno druga od druge oddaljene le nekaj metrov, kar predstavlja zelo preprost prenos povzročiteljev bodisi z zrakom bodisi z različnimi vektorji prenosa ter tudi z ljudmi.

Po vstopu Slovenije v EU smo si vnesli PRRS, ki velja za bolezen izjemno velikega ekonomskega pomena. V Sloveniji je bil leta 2010 in 2011 izveden monitoring, s katerim smo dokazali približno 48 % prevalenco. Samo posamezne reje se odločajo za ukrepanje zoper PRRS, saj večina rejcev zaradi pomanjkljivega beleženja proizvodnih podatkov (zlasti od odstavitve dalje) ne prepozna enormnih izgub, ki jih povzroča ta bolezen (3). Prav tako smo v Slovenijo vnesli prašičjo dizenterijo, klostridijski enteritis in zadnje leto tudi prašičjo epidemično drisko (PED) (4). Omeniti je treba še eno bolezen, ki se iz Ukrajine širi proti Evropi. Potrdili so jo že na Poljskem. To je afriška prašičja kuga, ki spada v Priloge o boleznih živali in sicer v priloge 1, 2, 3, 6, 10, 11.

Zaradi prostega trgovanja s prašiči in njihovimi izdelki, zaradi ne izvajanja osnovnih biovarnostnih ukrepov in zaradi pomanjkljivega znanja rejcev glede osnovnih biovarnostnih ukrepov in zdravstvenega varstva prašičev, je tako velika nevarnost širjenja tudi drugih patogenih mikrobov v Slovenijo. Če bi vsak rejec izvajal tako zunanje kot notranje biovarnostne ukrepe v svoji reji, bi se biovarnost iz posamezne reje razširila na regijo, kar bi gotovo pripomoglo k boljšemu zdravstvenemu stanju naših prašičev in ne nazadnje k bistveno večji ekonomiki prireje.

## Reference

1. Valenčak Z. The pig health control in Slovenia. In: The 17th International Pig Veterinary Society Congress, June 2-5, Ames, Iowa USA : proceedings. Ames, Iowa: International Pig Veterinary Society, 2002 (2): 301.
2. Valenčak Z. Developing of a system for heard health status improvement in pig production. In: Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, June 27 - July 1, 2004 Hamburg, Germany. Osnabrück: International Pig Veterinary Society, 2004: 581.
3. Toplak I, Štukelj M, Zabavnik Piano J, Hostnik P, Grom J, Valenčak Z. *Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2010: 40 str
4. Toplak I, Štukelj M, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J. First detection of porcine epidemic diarrhoea virus in Slovenia. In: Changing viruses in a changing world. 10<sup>th</sup> International Congress for Veterinary Virology and 9<sup>th</sup> Annual Meeting of EPIZONE. Montpellier, France, 2015: 178.

## Changes in Slovenian pig production after joining the European Union

Epidemiological situation in our country can be divided in two periods, before and after joining the European Union (EU). In year 2002 Slovenia produced 655.663 pigs and only 271.385 in year 2015. Before joining EU annual Order of Ministry for agriculture, forestry and food of Slovenia defined diseases which were part of monitoring: classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD), brucellosis, leptospirosis, transmissible gastroenteritis (TGE), porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), swine vesicular disease. Besides the obligatory also testing for other diseases were performed: enzootic pneumonia,

pleuropneumonia, swine influenza, porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, salmonellosis. Slovenia was free of PRRS till 2004, TGE, AD, CSF, swine vesicular disease, swine dysentery, brucellosis, clostridial enteritis, prevalence of salmonellosis in leptospirosis was very low. Obligatory quarantine (before joining EU) for imported pigs was essential for the good health situation. Now according to Order only testing for AD, classical and African swine fever remained in place therefore we have almost no data on health situation in Slovenian pig population. After joining EU PRRS swine dysentery, clostridial enteritis and porcine epidemic diarrhea were introduced. Free *pig trading* and non-implementation of biosecurity measures present a high risk of *importing other diseases into Slovenia*.

Key words: pig; poroduction; health status

# BIOMARKERJI V SEMENSKI PLAZMI KOT FAKTORJI NAPOVEDI KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA MERJAŠČEVEGA SEMENA

Maja Zakošek Pipan<sup>1\*</sup>, Janko Mrkun<sup>1</sup>, Breda Jakovac Strajn<sup>2</sup>, Katarina Pavšič Vrtač<sup>2</sup>, Janko Kos<sup>3,4</sup>, Anja Pišlar<sup>3</sup>, Alenka Nemec Svete<sup>5</sup>, Petra Zrimšek<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Klinika za reprodukcijo in velike živali, <sup>2</sup>Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, <sup>3</sup>Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, <sup>4</sup>Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, <sup>5</sup>Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, <sup>6</sup>Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

maja.zakosekpijan@vf.uni-lj.si

V raziskavi smo ugotavljali možnost napovedovanja kakovosti tri dni tekoče hranjenega merjaščevega semena s pomočjo parametrov oksidativnega stresa (superoksid dismutazo (SOD), skupno antioksidantno kapaciteto (TAC), in produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino (TBARS)), mikroelementov prisotnih v semenski plazmi (bakar (Cu), železo (Fe), cink (Zn) in selen (Se)) in faktorja TNF- $\alpha$ .

Aktivnost SOD izmerjena v semenski plazmi na dan odvzema semena je kot edini parameter oksidativnega stresa statistično značilno korelirala s preživitveno sposobnostjo semenčic in progresivno gibljivostjo po treh dneh hranjenja semena, prav tako je s preživitveno sposobnostjo semenčic korelirala koncentracija TNF- $\alpha$  ( $P < 0,05$ ). Med mikroelementi je koncentracija Se statistično značilno korelirala z večino parametrov kakovosti semena po hranjenju ( $P < 0,05$ ).

Glede na omenjene rezultate lahko kot dodatno metodo za določanje kakovosti semena po treh dneh hranjenja uporabimo koncentracijo Se, aktivnost SOD in koncentracijo TNF- $\alpha$  v sveži semenski plazmi. Aktivnost SOD in TNF- $\alpha$  smo tudi diagnostično ovrednotili in ugotovili, da sta oba zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Naši rezultati prispevajo k iskanju ustreznega markerja za napovedovanje kakovosti merjaščevega semena po tekočem hranjenju.

**Ključne besede:** merjaščevo seme; tekoče hranjenje; biomarkerji

## Uvod

V razvitih državah sveta za osemenje svinj najpogosteje uporabljamo kratkotrajno hranjeno merjaščevo seme, ki ga pred shranjevanjem pregledamo in tako določimo gibljivost, progresivno gibljivost, koncentracijo semenčic in delež morfoloških napak na semenčicah. S tem pregledom lahko uspešno izločimo vzorce semena neustrezne kakovosti, ne moremo pa zagotoviti, da bo seme ustrezne kakovosti takšno ostalo tudi po kratkotrajnem hranjenju (1). Potreba po zanesljivem biomarkerju, s katerim bi lahko napovedali kakovost semena po kratkotrajnem hranjenju pri 15-20°C, je torej velika (2). Pri ugotavljanju potencialnih biomarkerjev smo se odločili za:

- parametre oksidativnega stresa (superoksid dismutaza (SOD), skupna antioksidantna kapaciteta (TAC) in produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino (TBARS)), saj so merjaščeve semenčice močno občutljive na oksidativni stres, ki je prisoten tudi med

pripravo in tekočim hranjenjem semena, še posebej pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu semenčic (3),

- mikroelemente semenske plazme, saj v zadnjem obdobju odkrivamo njihovo pomembno vlogo pri plodnosti oziroma njihov vpliv na kakovost semena (4),
- TNF- $\alpha$ , v semenski plazmi merjascev, ker so bile ugotovljene številne korelacije s parametri kakovosti svežega semena (5).

## Material in metode

Ejakulati so bili takoj po odvzemu razredčeni z razredčevalcem BTS v razmerju 1:2 in dostavljeni v laboratorij, kjer smo jim določili koncentracijo, delež gibljivih, progresivno gibljivih in živih semenčic, ter delež semenčic z morfološkimi napakami. Določali smo tudi kapacitacijo semenčic in delež semenčic z akrosomalno reakcijo.

V sveži semenski plazmi smo določali vrednosti SOD, TAC, TBARS, TNF- $\alpha$  in mikroelemente (Se, Zn, Cu, Fe). Dodatno smo določali tudi DNK fragmentacijo, membranski in mitohondrijski potencial ter integriteto membrane semenčic s testom HOST.

Parametre oksidativnega stresa (TBARS in SOD), ter faktor TNF- $\alpha$ , izmerjene v semenski plazmi svežega merjaščevega semena, smo diagnostično ovrednotili z vidika napovedi kakovosti merjaščevega semena po kratkotrajnem hranjenju. S pomočjo analize ROC (karakteristika sprejemnika), smo določili specifičnost in občutljivost testa pri vseh možnih mejnih vrednostih. Določili smo optimalno mejno vrednost določenih parametrov, na podlagi katerih smo najzanesljiveje ločili vzorce semena v ustrezne in neustrezne po treh dneh hranjenja. Kriteriji za ustrezne vzorce so bili: preživitvena sposobnost > 85 %; delež gibljivih semenčic > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic > 50 % .

## Rezultati

Med oksidativnimi parametri je TBARS statistično značilno koreliral z gibljivostjo semenčic ( $P < 0,05$ ), aktivnost SOD pa s preživitveno sposobnostjo semenčic in progresivno gibljivostjo ( $P < 0,05$ ). Med mikroelementi je koncentracija Se statistično značilno pozitivno korelirala z gibljivostjo, progresivno gibljivostjo, preživitveno sposobnostjo, morfološko normalnimi semenčicami in semenčicami z nepoškodovano DNK, ter negativno korelirala z deležem mrtvih semenčic, deležem semenčic z akrosomalno reakcijo in deležem semenčic s poškodovano integriteto membrane semenčic ( $P < 0,05$ ). TNF- $\alpha$  je statistično značilno koreliral s preživitveno sposobnostjo semenčic po treh dneh hranjenja semena ( $P < 0,05$ ). SOD in TNF- $\alpha$  sta zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Tako lahko z 92 % zanesljivostjo napovemo, da bo imelo seme, v katerem je vrednost TNF- $\alpha$  izmerjena v sveži semenski plazmi višja od 150 pg/ml, več kot 85 % živih semenčic po treh dneh hranjenja. Z aktivnostjo SOD nižjo kot 1,05 U/ml v sveži semenski plazmi lahko z 88 % zanesljivostjo napovemo, da bo seme po treh dneh hranjenja ustrezalo kriterijem za ustrezne vzorce semena po hranjenju, in kar s 100 % zanesljivostjo, da seme, ki bo imelo aktivnost SOD višjo kot 1,05 U/ml, po treh dneh hranjenja ne bo ustrezno.

## Zaključki

Rezultati te raziskave predstavljajo pomemben korak k ugotavljanju novih enostavnih testov, s katerimi bi lahko uspešneje napovedali oploditveno sposobnost hranjenega semena.

Določanje faktorja TNF- $\alpha$  in aktivnosti SOD izmerjenih v sveži semenski plazmi sta se namreč izkazala kot zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja pri 15 – 17 °C in bi torej lahko predstavljala enostaven korak pri presoji ustreznosti merjaščevega semena namenjenega za shranjevanje. Tudi določanje mikroelementov v semenski plazmi dobro korelira s parametri kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Glede na to, da je Se koreliral tudi z deležem semenčic z nepoškodovano DNK in deležem semenčic s poškodovano integriteto membrane semenčic, lahko na podlagi merjenja koncentracije Se predvidevamo tudi lastnosti semena, ki jih z običajnimi, rutinskimi testi ne moremo.

## Reference

1. Flowers WL. Selection for boar fertility and semen quality – the way ahead. *Reprod Dom Anim* 2011; 46 (2): 55-8.
2. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 2010; 121(1-2): 131-8.
3. Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, et al. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 162-71.
4. Lopez Rodríguez A, Rijsselaere T, Beek J, Vyt P, Van Soom A, Maes D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2013; 59: 5–12.
5. Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim Reprod Sci* 2007; 99(1-2): 72-81.

## Biomarkers in seminal plasma as predicting factors for semen quality after storage

In our research we established possibility of predicting boar semen quality after 3 days of liquid storage with oxidative stress parameters (superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)), trace elements (copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and selenium (Se)) present in seminal plasma (Experiment 2) and TNF- $\alpha$ .

SOD activity in seminal plasma on day of semen collection was the only oxidative stress biomarker that significantly correlated with viability and progressive motility after three days of storage. TNF- $\alpha$  also significantly correlated with viability ( $P < 0.05$ ). Among trace elements Se significantly correlated with most of the semen quality parameters after storage ( $P < 0.05$ ).

According to these results evaluation of Se, SOD and, TNF- $\alpha$  in fresh boar seminal plasma can serve as an additional tool in predicting semen quality after storage. Even more, we diagnostically evaluated SOD and TNF- $\alpha$  in fresh seminal plasma as predictors for semen quality outcome on the third day of semen storage and found out that they can be used as a predictor of semen quality after 3 days of storage. These findings contribute to the selection of new biomarker for predicting sperm characteristics in boar semen following storage.

Key words: boar semen; liquid storage; biomarkers

# ŠTUDIJA PRIMERA: PRAŠIČJA EPIDEMIČNA DRISKA (PED) NA FARMI PRAŠIČEV PITANCEV V SLOVENIJI

Jan Plut<sup>1\*</sup>, Irena Golinar Oven<sup>1</sup>, Polona Juntos<sup>2</sup>, Tonček Gider<sup>3</sup>, Marina Štukelj<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinike za reprodukcijo in velike živali, Klinika za prežvekovalce in prašiče, <sup>2</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Enota za patologijo ter sodno in upravno veterinarstvo, Veterinarska fakulteta, 1000 Ljubljana, <sup>3</sup>Panvita, Veterina d.o.o., 9000 Murska Sobota, Slovenija

jan.plut@vf.uni-lj.si

Virus prašičje epidemične driske (PEDV) prizadene vse kategorije prašičev in povzroča profuzno drisko, bruhanje, slabšo konverzijo krme in slabši povprečni dnevni prirast, pri sesnih pujskih je pogin lahko 100 %. Klinična znamenja običajno izginejo približno po treh tednih, če ne dodajamo novih prašičev. V Sloveniji smo virus PED prvič dokazali januarja leta 2015. V proučevani reji pitancev je na dan naselitve imel en pitanec hudo vodeno in krvavo drisko in je še isti dan poginil, 4-5 pitancev je imelo blago drisko. Čez štiri dni se je pri vseh živalih pojavila močna vodena driska in neješčnost, prašiči so bili potrti, močno zamazani z iztrebki, shujšani in dehidrirani, najbolj prizadeti so kazali živčne znake, kot so tresenje, krči, težave pri vstajanju in nekoordinirano gibanje. Klinični znaki so vztrajali in še 14 dni po naselitvi so imeli vsi prašiči zmerno do močno vodeno drisko. Vzorce seruma smo testirali z ELISA na prisotnost protiteles proti PEDV. Vsi serumi so bili pozitivni. V čredi je bila 100 % obolevnost s prevladujočimi znaki močnega črevesnega vnetja, smrtnost pa 1,33 %. 19. dan po naselitvi so klinični znaki začeli postopoma izginjati, blago drisko so imeli samo še posamezni pitanci. 21. dan noben prašič ni imel več driske.

Ključne besede: pitanci; PED; klinična znamenja

## Uvod

Virus prašičje epidemične driske (PED) uvrščamo v družino *Coronaviridae* in v rod *Alphacoronavirus*. Bolezen so prvič opisali leta 1971 pri pitancih v Veliki Britaniji. V Evropi so se epidemije bolezni pojavljale v 70-ih in 80-ih letih prejšnjega stoletja. Kasneje se je PED pojavljala zgolj občasno, večinoma kot driska pri odstavljenih in pitancih (1). Bolezen je znova postala gospodarsko zelo pomembna s pojavom visoko patogenih sevov virusa na Kitajskem leta 2010. Leta 2013 so visoko patogeno obliko PED potrdili tudi v ZDA, kjer se je virus v dveh letih močno razširil in povzročal veliko gospodarsko škodo (2). Pri visoko patogenih sevih PED opazimo močno vodeno drisko, bruhanje, anoreksijo in hujšanje. Bolezen prizadene vse kategorije prašičev. Pri sesnih pujskih je smrtnost lahko tudi do 100 %, pri drugih kategorijah poteka z blažjimi kliničnimi znaki. Prizadeti prašiči slabše priraščajo, kar znatno vpliva na proizvodne rezultate. Ne glede na sev PEDV se bolezen sama omeji, če v rejo ne dodajamo novih prašičev. Leta 2014 so poročali o posamičnih pojavih PED v Evropi, in sicer v Nemčiji, Franciji in Belgiji, kjer so izolirali nizko patogene seve virusa (3). V Sloveniji smo virus PED prvič dokazali januarja leta 2015 v črevesni vsebini z metodo rtPCR (4) in v črevesni sluznici z imunohistokemično metodo. Izolirani sev virusa je kazal 99,7 % identičnost nukleotidov z nemškim sevom GER/L00721/2014 (4). Nizko patogeni sevi povzročajo zelo podobna klinična znamenja kot visoko patogeni



sevi, vendar so ta znamenja blažja. Obolevnost pri nizko patogenih sevih se približa 100 %, smrtnost pa je majhna. Klinična znamenja izginejo po približno treh tednih (5), če v rejo ne dodajamo novih prašičev. Izgube nastajajo zaradi slabših proizvodnih rezultatov. Namen študije je predstavitev kliničnega poteka PED na farmi pitancev v Sloveniji in poudariti pomen biovarnostnih ukrepov, ki so potrebni za učinkovito preprečevanje vnosa bolezni v čredo.

## Material in metode

### *Farma*

Klinični primer izbruha bolezni smo proučevali v manjši reji pitancev, ki je bila do vselitve nove skupine prašičev brez bolezenskih znamenj. Pred naselitvijo novih prašičev je bilo poslopje izpraznjeno, očiščeno z visokotlačno črpalko in razkuženo. Lastnik je v hlev naselil pitance tri dni kasneje.

### *Živali*

V novi skupini je bilo 150 tekačev, starih 10 tednov in ob vhlevitvi so imeli 26 kg. Tekači so izvirali s slovenske farme, ki je od pitovne farme oddaljena več kot 200 kilometrov.

### *Anamneza in začetni klinični pregled*

Lastnik od prodajalca ni zahteval zdravstvenega potrdila, ki bi zagotavljalo, da so živali proste PED. Prav tako ni izvedel, ali je bilo vozilo pred nakladanjem prašičev očiščeno, razkuženo in posušeno, kot tudi ne, ali je dostavilo prašiče neposredno z mesta izvora in ali se je na poti ustavilo še na kakšnem drugem gospodarstvu, kjer redijo prašiče. Na dan naselitve je imel en pitanec hudo vodeno in krvavo drisko in je še isti dan poginil. Patomorfološke preiskave niso opravili. Še 4 ali 5 pitancev je imelo blago drisko. Druge živali niso kazale znakov bolezni. Čez štiri dni se je pri vseh prašičih pojavila močna vodena driska in neješčnost. Lastnik je o bolezni obvestil lečečega veterinarja. Veterinar je za zdravljenje predpisal antibiotik Linco Spectin® (linkomicin in spektinomicin) in aktivno oglje kot dodatek krmi. Klinična znamenja so vztrajala in še 14 dni po naselitvi so imeli vsi prašiči zmerno do močno vodeno drisko. Še en prašič je poginil. Tako intenzivnih težav z drisko na farmi v zadnjih petih letih niso imeli. Na podlagi anamnestičnih podatkov in opažanj, pridobljenih pri ogledu farme in kliničnemu pregledu prašičev, smo posumili na PED in odvzeli vzorce za laboratorijske preiskave.

### *Vzorčenje*

Trinajst dni po vhlevitvi smo odvzeli kri desetim naključno izbranim pitancem, starim 12 tednov.

### *Serologija*

Vzorke seruma smo testirali na prisotnost IgG protiteles s komercialno indirektno ELISO (Swinecheck® PED indirect ELISA kit, Biovet). Izvedba testa in interpretacija rezultatov je potekala po navodilih proizvajalca. Optično gostoto (OD) vzorcev smo izmerili z optičnim

čitalcem Sunrise® (TECAN). Glede na vrednosti OD, smo izračunali razmerje S/P (angl.: *sample to positive ratio*). Vzorce smo razdelili na PED pozitivne (S/P več kot 0.4) in PED negativne (S/P manj kot 0.4).

## Rezultati

V čredi je bila obolevnost 100 % s prevladujočimi znamenji močnega črevesnega vnetja. Prašiči so bili potrjeni, shujšani, dehidrirani in močno zamazani z iztrebki. V neformiranih iztrebkih so bili delci neprebavljene krme. Najbolj prizadete živali so kazale živčne znake, kot so tresenje, krči, težave pri vstajanju in nekoordinirano gibanje. Umrljivost je bila nizka. Poginila sta 2 pitalca od 150-ih, pomeni 1,33 % smrtnosti. Z analizo seruma smo potrdili protitelesa proti virusu PED v vseh desetih vzorcih (Tabela 1).

Močna bolezenska znamenja so bila v čredi od prvega pojava vidna približno tri tedne; 19. dan po naselitvi so klinični znaki začeli postopoma izginjati, apetit in splošno stanje prašičev sta se izboljšala, blago drisko so imeli samo še posamezni pitalci. 21. dan noben prašič ni imel več driske. 47. dan po vhlavitvi (starost 117 dni) so pitalci pridobili okoli 29 kg (telesna masa okoli 55 kg). Pitalci so v tem času priraščali povprečno 0.617 kg/dan. Lastnik ocenjuje, da so pitalci v času bolezni pojedli po 2 do 3 kilograme manj krme kot običajno.

Tabela 1: OD vrednosti vzorcev seruma. Vsi vzorci so bili glede na OD vrednost PED pozitivni

Št vzorca	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD vrednost	2.747	2.894	1.837	2.677	1.932	2.171	2.600	2.794	2.755	2.757
Razmerje S/P	2.210*	2.333*	1.449*	2.151*	1.528*	1.728*	2.087*	2.249*	2.217*	2.218*

\* Vzorci z razmerjem S/P več kot 0.4 so PED pozitivni

## Razprava

Z natančno epidemiološko analizo, kliničnimi preiskavami in pravilno diferencialno diagnostično usmerjeno preiskavo, smo v obravnavani čredi obolelih prašičev potrdili sum PED, kar je prvi dokumentiran primer PED na tem gospodarstvu. Način izbruha bolezni, klinični znaki, potek bolezni in odstotek obolevnosti v čredi se ujemajo z opisom PED, ki ga povzročajo nizko patogeni sevi tega virusa (1, 5). Prvi primeri bolezni so se v čredi pojavili 3 dni po vselitvi novih prašičev, bolezenski znaki so se stopnjevali do dvajsetega dneva po izbruhu prvega primera, nato pa postopoma izginili. Bolezenska slika se v tej čredi ujema s potekom bolezni v čredi prašičev, v kateri smo v Sloveniji januarja 2015 prvič potrdili PED, ki ga je povzročil nizko patogeni sev virusa (4). Zato domnevamo, da gre tudi tokrat za takšen sev PEDV. Kljub nizki smrtnosti, je bila na gospodarstvu povzročena precejšnja ekonomska škoda, saj je bil v času bolezni prirast zmanjšan približno za 16 %. Pred izvajanjem ukrepov sanacije bolezni, bi si moral vsak rejec znati odgovoriti na vprašanja: kako je prišlo do vnosa bolezni v rejo, še bolj pa, kaj bi moral narediti, da do vnosa sploh ne bi prišlo? Odgovor na prvo vprašanje je ključnega pomena, da si po izvajanju ukrepov odpravljanja posledic bolezni v čredo ponovno ne vnesemo bolezni. Kritični biovarnostni ukrepi, ki so nujni za preprečevanje vnosa bolezni v gospodarstvo so nakup prašičev iz čim manj različnih virov, nakup živali preverjeno prostih določenih patogenih mikrobov, transport prašičev z očiščenimi, razkuženimi in posušenimi transportnimi sredstvi in dostava živali neposredno

na gospodarstvo, ustrezno nakladanje in razkladanje in vselitev prašičev v čiste in razkužene hleve, ki so prazni vsaj en teden. Anamnestični podatki kažejo, da so biovarnostne ukrepe na tem gospodarstvu izvajali pomanjkljivo in da številni, nujno potrebni podatki niso bili preverljivi. Pitanci so bili naseljeni v izpraznjen, očiščen in razkužen hlev, vendar že 3 dni po izselitvi prejšnjih pitancev in razkuževanju. Ostali ukrepi pa so bili pomanjkljivi ali pa jih niso izvajali. Na primer: nadzor nad vstopanjem obiskovalcev v hlev je bil pomanjkljiv, obiskovalci se pred vstopom niso preoblačili in preobuvali, pred vhodom v rejo ni bila nameščena dezinfekcijska bariera. Tako je možno, da je virus na farmo vnesel človek. Obstaja tudi možnost, da bi se prašiči lahko okužili med transportom, saj natančna pot živali od prodajalca do kupca ni znana. Z ustreznimi biovarnostnimi ukrepi bi se rejec lahko izognil vnosu bolezni, stroškom zdravljenja in izgubam zaradi slabših proizvodnih rezultatov. Poleg omenjenega pa pozitivna reja predstavlja potencialno nevarnost tudi za druge rejce. V Sloveniji še vedno namenjam premalo pozornosti biovarnostnim ukrepom, s katerimi bi preprečili vnos bolezni v državo in prenos med gospodarstvi, posebno, če gre za ekonomsko pomembne bolezni. V to skupino bolezni uvrščamo tudi PED, ki tako kot številne druge živalske bolezni ni navedena v Pravilniku o boleznih živali in zato tudi ni predpisanih ukrepov ob pojavu bolezni. Rejci so o bolezni slabo obveščeni in poučeni, zato nanjo tudi niso dovolj pozorni, kljub očitnim negativnim posledicam, ki vplivajo na zdravje živali, na dobrobit prašičev in nazadnje tudi na manjši dohodek.

## Reference

1. Saif LJ, Pensaert MP, Sestak K, Yeo SG, Jung K. Coronaviruses. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. *Diseases of Swine*, Tenth Ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012: 501–24.
2. Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 2013; 4(5):00737-13. doi:10.1128/mBio.00737-13.
3. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 2015; 204: 134–43.
4. Toplak I, Štukelj M, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J. First detection of porcine epidemic diarrhea virus in Slovenia, 2015. In: 10th international congress for veterinary virology. Montpellier: Le Corum 2015: 178.
5. Martelli P, Lavazza A, Nigrelli AD, Meriardi G, Alborali LG, Pensaert MB. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 2008; 162: 307–10.

## Case report: Porcine epidemic diarrhea (PED) on pig fattening farm in Slovenia

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDv) affects pigs of all categories. It causes profuse diarrhea, vomiting, lower feed conversion and lower average daily gain. Mortality in suckling piglets can reach 100 %. Low-pathogenic form of PED is usually self-limiting. Clinical signs disappear after approximately three weeks, if no new animals added. PEDv was first discovered in Slovenia in January 2015. On day of in-housing, one fattener had severe bloody and watery diarrhea and died on same day, 4-5 fatteners had mild diarrhea. On day 4, all fatteners suffered from severe watery diarrhea, anorexia and depression, pigs

were covered in feces, lean and dehydrated. The most affected pigs developed neurological signs such as tremor, cramps, trouble standing up and uncoordinated movement. On day 14, all fatteners had moderate to severe diarrhea. Sera samples were tested for presence of anti-PED antibodies with commercial indirect ELISA. All sera samples were positive. Herd morbidity was 100% with leading clinical signs of severe enteritis. Mortality was estimated at 1.33%. On day 19, clinical signs started fading, only few fatteners showed mild diarrhea. Clinical signs entirely disappeared on day 21.

Key words: fatteners; PED; clinical signs

# IZVAJANJE MONITORINGA NA PRISOTNOST VIRUSA IN PROTITELES AFRIŠKE PRAŠIČJE KUGE MED LETI 2014 IN 2015 V SLOVENIJI

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Danijela Rihtarič<sup>1</sup>, Gorazd Vengušt<sup>2</sup>, Diana Žele<sup>2</sup>, Peter Hostnik<sup>1</sup>, Jože Grom<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Afriška prašičja kuga (APK) je kompleksna virusna bolezen, ki je v visokem odstotku smrtna za prašiče in pomembno vpliva na promet z živimi prašiči v okuženi regiji, državi in v mednarodni trgovini. Divji prašiči so lahko pomemben vir okužbe za domače prašiče in pokazatelj vztrajanja okužbe na nekem področju. Protitelesa, ki jih ugotovimo zgodaj po okužbi se daljši čas ohranijo v krvi obolelih prašičev, zato je dokazovanje protiteles, skupaj z dokazovanjem virusa APK, pomembno diagnostično orodje pri izvajanju programa nadzora. Leta 2014 smo v okviru letne odredbe zbrali 537 vzorcev, leta 2015 pa 432 vzorcev serumov divjih prašičev ter jih testirali na prisotnost protiteles s testom ELISA. Specifičnih protiteles APK nismo dokazali v nobenem vzorcu. Dodatno smo v tem obdobju z metodo PCR v realnem času na prisotnost virusa APK testirali skupno 588 vzorcev organov poginjenih domačih prašičev ter 36 vzorcev poginjenih divjih prašičev. Prisotnosti virusa APK nismo dokazali v nobenem od preiskovanih vzorcev. Monitoring na APK smo v Sloveniji izvedli prvič in s tem pridobili pomembne izkušnje z odvzemom vzorcev in rutinskim izvajanjem testov za diagnostiko APK. V primeru izbruha je ključno zgodnje odkrivanje in hitra potrditev povzročitelja, da bi preprečili nadaljnjo širjenje virusa.

Ključne besede: Afriška prašičja kuga; monitoring; dokazovanje; prašiči

## Uvod

Afriška prašičja kuga se je ponovno vnesla na evropski kontinent leta 2007, ko so zabeležili prvi izbruh bolezni v Gruziji. Virus genotipa II se je nato hitro raznesel v sosednje države in zajel celotno Kavkaško regijo, vključno z Rusijo, Ukrajino in Belorusijo (1). Sočasne okužbe v populaciji domačih in divjih prašičev so povzročile nastanek endemično okuženih območij v državah vzhodnega dela Evrope. Leta 2014 so prve primere ugotovili v štirih članicah Evropske unije (EU); v Litvi, Poljski, Latviji in Estoniji. Prvi primeri bolezni so bili v vseh štirih državah povezani z najdbo poginjenih divjih prašičev. Divji prašiči igrajo na endemično okuženih območjih pomembno vlogo pri ohranjanju virusa v regiji (2). Zaradi kompleksnih varnostnih, ekonomskih, socioloških in okoljskih danosti je nadzor bolezni na obsežnih endemično okuženih območjih pomanjkljiv, kar predstavlja stalno nevarnost za širjenje virusa na neokužena območja in stalno grožnjo prašičereji v državah EU (3). V Sloveniji APK še nismo ugotovili, vendar obstaja realna nevarnost, da se virus v prihodnosti vnese med divje ali domače prašiče. Redno strokovno izobraževanje, striktno izvajanje preventivnih ukrepov in zgodnje odkrivanje okužbe lahko bistveno zmanjša ekonomsko škodo in prepreči nadaljnje širjenje bolezni.

## Material in metode

V okviru letne odredbe smo leta 2014 zbrali 537 vzorca serumov in leta 2015 432 vzorcev serumov odstreljenih divjih prašičev ter jih testirali na prisotnost protiteles s testom ELISA (4, 5). Uporabili smo komercialni test (INGEZIM PPA Compac 1.1.PPA.K3) in testiranje izvedli po navodilih proizvajalca. V skladu z diagnostičnim priporočilom OIE in priporočilom EU referenčnega laboratorija (EURL) smo vse pozitivne in sumljive vzorce v testu ELISA testirali s potrditveno metodo imunobloting za specifični dokaz protiteles APK. Test smo izvajali po protokolu, ki smo ga pridobili iz EURL.

Na prisotnost virusa APK smo z metodo PCR v realnem času v letu 2014 testirali 286 vzorcev organov poginjenih domačih prašičev v letu 2015 pa 302 vzorcev. V istem obdobju smo na prisotnost virusa testirali tudi 36 vzorcev divjih prašičev, ki so bili najdeni poginjani. Izolacijo nukleinske kisline smo izvedli s komercialnim kompletom, dokaz virusa pa z metodo PCR v realnem času po priporočenem protokolu EURL, ki ga uporabljamo v laboratoriju za dokaz virusa APK.

## Rezultati

V okviru letne odredbe smo v letih 2014 in 2015 testirali skupno 969 vzorcev serumov divjih prašičev na prisotnost protiteles v testu ELISA. Leta 2014 smo v testu ELISA ugotovili 9 vzorcev, ki so reagirali pozitivno, leta 2015 pa 4 vzorce, skupno 13 vzorcev (1,39%). Te smo v nadaljevanju testirali s potrditvenim testom imunoblotinga. V nobenem od 13 vzorcev nismo ugotovili specifičnih protiteles proti virusu APK. Virusa APK z metodo PCR v realnem času nismo dokazali v nobenem od 588 vzorcev domačih in 36 vzorcev poginjenih divjih prašičev.

## Razprava

Monitoring na APK je bil v letu 2014 v Sloveniji uveden iz dveh razlogov. Prvi je bil dvigniti pripravljenost laboratorijskih kapacitet za testiranje vzorcev na prisotnost virusa in protiteles APK, drugi razlog pa je povečati zavedanje o nevarnosti vnosa APK v Slovenijo in pomenu kontrole APK pri divjih prašičih. Negativni rezultati izvedenega monitoringa potrjujejo odsotnost bolezni. Vsekakor že več kot enoletno vztrajanje okužbe v štirih okuženih članicah EU, kljub velikim naporom za izkoreninjenje APK ne daje dobrih obetov, da se bo nevarnost v Evropi hitro zmanjšala. Kako doseči kontrolo APK pri divjih prašičih in izkoreniniti APK v EU še vedno ni popolnoma jasno, čeprav je zakonodaja predpisana in se izvaja. Pri vnosu virusa v novo državo je ključno, da se prepreči prenos na divje prašiče, ker je bolezen potem težje zatirati in sčasoma povzroči nastanek endemično okuženega območja. Prav tako je že jasno, da evropske izkušnje z zatiranjem klasične prašičje kuge pri APK ne dajejo zadovoljivih rezultatov in bo zato potrebno v prihodnje prilagoditi in uvesti nekatere nove ukrepe, specifične za zatiranje virusa APK. Prav tako je potrebno v Sloveniji nameniti več pozornosti takojšnji postavitvi suma ob zaznavanju večjih poginov pri domačih ali divjih prašičih, izobraževanju in osveščanju rejcev ter natančnemu izvajanju preventivnih ukrepov.

## Reference

1. Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D. African swine fever in North Caucasus Region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res* 2013; 173: 198–203.
2. Sanchez-Vizcaino JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol* 2015; 152: 9–21.
3. Costard C, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeifer DU. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 2013; 173: 191–7.
4. Odredba o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali v letu 2014. *Ur List RS* 2013; št. 100: 11018.
5. Odredba o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali v letu 2015. *Ur List RS* 2014; št. 24(91): 10223-27.

## Monitoring of African swine fever virus and antibodies between 2014 and 2015 in Slovenia

African swine fever (ASF) is a complex and lethal disease of swine with major negative impact on regional, national and international trade. The wild boar can be important source of virus infection for domestic pig population and indicator of ASF virus persistence in the environment. The early appearance and long term persistence of ASF antibodies make the antibody detection techniques together with virus detection essential in control programmes. During 2014 a total of 537 samples and in 2015 432 wild boar serum samples were collected within national annual decree for ASF and tested by ELISA for presence of antibodies. All samples were negative for ASF antibodies. In addition 588 pig tissue samples of dead domestic pigs and 36 samples from wild boars found dead were collected and tested by real-time PCR for detection of ASF virus. No virus was detected in tested samples. This was the first monitoring of ASF conducted in Slovenia and first important experiences in our country with samples collection and routine testing for ASF. In case of an outbreak the early detection and rapid diagnosis of ASFV and fast veterinary service on the field are of essential importance for preventing further spreading and eradication of virus.

Key words: African swine fever; monitoring; detection; pig

# PRVA UGOTOVITEV IN GENETSKA KARAKTERIZACIJA PRAŠIČJIH BOKAVIRUSOV V SLOVENIJI

Zoran Žlabravec<sup>1</sup>, Petra Raspor Lainšček<sup>2</sup>, Danijela Rihtarič<sup>3</sup>, Ivan Toplak<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Veterinarska fakulteta, <sup>2</sup>Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, <sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Raziskavo dokazovanja prašičjih bokavirusov (PBoV) smo izvedli na vzorcih blata, odvzetih od 50 živih in 86 poginjenih prašičev iz 54 različnih slovenskih rej. Uvedli in optimizirali smo metodo PCR v realnem času, s katero smo dokazovali nukleinsko kislino PBoV v regiji NP1 virusnega genoma. Prisotnost PBoV smo dokazali pri 38 % živih in 34,9 % vzorcev poginjenih prašičev. Za potrebe tipizacije PBoV smo uvedli klasično metodo PCR za pomnoževanje odseka regije NS1 genoma PBoV v dolžini 680 nukleotidov. 11 pozitivnim vzorcem PBoV iz 5 različnih rej smo uspešno določili nukleotidno zaporedje v dolžini 636 nukleotidov. Primerjava nukleotidnega zaporedja je pokazala 78,5–100 % identičnost in 76,4–100 % identičnost aminokislinskega zaporedja med tipiziranimi sevi v Sloveniji. Ugotovljeni PBoV iz Slovenije so se uvrstili v dve različni genetski skupini znotraj vrste PBoV3; v skupino I PBoV3 smo uvrstili 10 vzorcev, v skupino IV PBoV3 pa en tipiziran vzorec. Novo ugotovljeni sev iz skupine IV PBoV3 ima le 78,5–80,7 % identičnosti nukleotidov s preostalimi sevi iz Slovenije. Genetsko najbližji mu je sev iz Kitajske, s katerim ima le 84 % identičnosti nukleotidnega zaporedja v primerjani regiji. Primerjava nukleotidnega zaporedja PBoV, tipiziranih znotraj istih rej, je pokazala, da sta v dveh rejah istočasno krožila dva genetsko različna seva PBoV, kar je dokaz okužbe reje iz dveh različnih virov.

Ključne besede: prašičji bokavirus; diagnostika; polimerazna; verižna reakcija; filogeneza; Slovenija

## Uvod

Z uvozom prašičev iz drugih držav, se v naše reje vnašajo nekateri že znani povzročitelji bolezni, občasno pa zaznavamo tudi nove patogene, s katerimi se prašičje reje v Sloveniji prvič srečujejo. Nekatero od novih povzročiteljev hitro zaznamo, drugi pa predstavljajo precejšen izziv pri kliničnem prepoznavanju bolezni, vzorčenju in diagnostiki. Med novejšo viruse, ki so jih na Švedskem prvič ugotovili leta 2009, spada tudi prašičji bokavirus (PBoV), ki pri prašičih povzroča drisko (1). Genom bokavirusov predstavlja linearna enojnovijačna molekula DNA, ki obsega okrog 5.000 nukleotidov (nt). Ima tri odprte bralne okvirje (ORF), ORF 1, ORF 2 in ORF 3, ki kodirajo štiri proteine. Omenjeni virus so ugotovili tudi pri drugih živalskih vrstah, tudi pri človeku in ima tudi potencialno morebitni zoonotski značaj. Podatkov o razširjenosti okužb s PBoV je v Evropi malo, v Sloveniji pa še ni bila izvedena nobena študija.



## Material in metode

V okviru izvedene raziskave smo opravili vzorčenje blata pri 86 poginjenih prašičih in pri 50 prašičih na klavni liniji. Iz 136 vzorcev blata smo izolacijo nukleinskih kislin izvedli z QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). Z metodo PCR v realnem času smo dokazovali kratek odsek virusnega genoma v regiji virusnega genoma PBoV, ki kodira nestrukturni protein (NP1). S klasično metodo smo pomnožili odsek virusnega genoma PBoV v dolžini 680 nukleotidov v regiji, ki kodira nestrukturni protein (NS1). Produkta PCR specifične velikosti 14 vzorcev smo očistili in jim z metodo po Sangerju določili nukleotidno zaporedje in s pomočjo računalniškega program DNASTAR uredili posamezno zaporedje.

## Rezultati

V vzorcih blata, ki smo jih odvzeli pri poginjenih prašičih, smo PBoV ugotovili pri 30 (34,9 %) od 86 pregledanih vzorcev. Od 50 vzorcev blata prašičev, odvzetih na klavnici pri klinično zdravih pitancih, smo PBoV dokazali pri 19 (38 %) prašičih. 11 pozitivnim vzorcem smo uspešno določili nukleotidno zaporedje v dolžini 636 nt. Glede na razdelitev PBoV, ki jo je postavil Huang s sodelavci (2), so se naši pozitivni vzorci razvrstili v dve različni skupini vrste PBoV3. 10 pozitivnih vzorcev se je uvrstilo v skupino 1 PBoV3, en pozitivni vzorec pa je bil uvrščen v skupino IV PBoV3. V skupini I PBoV3 so poleg naših 10 vzorcev uvrščeni tudi sevi iz ZDA, Hrvaške, Madžarske, Irske in Kitajske. V skupini IV PBoV3 so poleg našega seva uvrščeni tudi sevi iz Irske, Kitajske in ZDA.

## Razprava

Prvič smo dokazali prisotnost PBoV pri prašičih v Sloveniji in v laboratorijsko diagnostiko vpeljali molekularne metode za dokazovanje in tipizacijo PBoV. S testiranjem novo uvedene metode PCR v realnem času smo ugotovili, da je metoda zelo učinkovita, ponovljiva, obnovljiva in specifična za dokaz PBoV. Z metodo PCR v realnem času smo dokazali nukleinsko kislino gena NP1 PBoV pri več kot eni tretjini od pregledanih živih in poginjenih prašičev. Zaradi majhnega števila testiranih vzorcev nam ta rezultat ne odraža dejanske prevalence PBoV v Sloveniji, potrjuje pa prisotnost PBoV v večjem številu rej. Za ugotovitev dejanske prevalence bi morali v raziskavo zajeti večje število prašičev s statistično dovolj velikim vzorcem prašičev iz različnih rej. S primerjavo 11 nukleotidnih zaporedij PBoV v dolžini 636 nt iz petih različnih slovenskih rej smo ugotovili prisotnost genetsko zelo heterogenih PBoV, ki so posledica trgovanja med našimi rejami in uvoza iz drugih držav; na ta način se verjetno prenašajo tudi PBoV. Primerjava nukleotidnega zaporedja gena NS1 med bokavirusi je pokazala, da smo pri prašičih ugotovili različne seve, kot so jih leta 2011 v Sloveniji ugotovili pri človeku (3). Prvi dokaz PBoV v Sloveniji, izvedena genetska tipizacija 11 PBoV ter dve novi uvedeni molekularni metodi za dokaz PBoV so dobra izhodišča, na podlagi katerih bodo lahko na tem virusu pri prašičih v prihodnje izvedene nadaljnje študije. Sekvence v dolžini 636 nukleotidov za 11 pozitivnih vzorcev PBoV so na voljo v genski banki pod zaporednimi številkami od KR706506 do KR706516.

## Reference

1. Blomstrom AL, Belak S, Fossum C, et al. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res* 2009; 146: 125–9.
2. Huang J, Mor SK, Erber J, Boss E, Goyal SM. Detection and characterization of porcine bocavirus in the United States. *Arch Virol* 2014; 159: 1797–801.
3. Uršič T, Steyer A, Kopriva S, Kalan G, Krivec U, Petrovec M. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1179–81.

## First detection and genetic characterization of porcine bocavirus in Slovenia

In this study the detection of porcine bocavirus (PBoV) was performed on feces samples of 50 live and 86 dead pigs from 54 different Slovenian pig herds. For the detection of nucleic acid of PBoV in NP1 region of viral genome a real-time PCR method was developed and optimised. The nucleic acids of PBoV were detected in 38 % samples of live pigs and in 34,9 % samples of dead pigs. PCR method for amplification of NS1 part of viral genome in a length of 680 nucleotides was implemented for genotyping of PBoV. For eleven positive samples PBoV, collected from 5 different herds, the nucleotide sequence in a length of 636 nucleotides was determined. The comparison of eleven determined sequences from Slovenia showed 78,5–100 % nucleotide identity and 76,4–100 % amino acid identity to each other. Identified PBoV from Slovenia were clustered into two different genetic groups within the species PBoV3. Ten samples were classified into group I PBoV3 and one sample into group IV PBoV3. New strain from group IV PBoV3 was discovered, with 78,5–80,7 % nucleotide identity to other strains from Slovenia. Genetically most closely related strain was from China, with only 84 % nucleotide identity. The comparison of nucleotide sequences PBoV identified within the same herd showed that in two herds genetically two different strain of PBoV were circulated simultaneously, which is the evidence of the introduction of PBoV from two different sources.

Key words: porcine bocavirus; diagnostics; polymerase chain reaction; phylogeny; Slovenia



---

**Perutnina**

Poultry

# HEMAGLUTININI IN NEVRAMINIDAZE PATOGENIH VRST RODU *Mycoplasma*

Dušan Benčina

Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1000 Ljubljana, Slovenija

Tako kot pri nekaterih patogenih virusih, npr. virus influence A, sta tudi pri nekaterih vrstah patogenih mikoplazem hemaglutinin in nevraminidaza dejavnika odločilna za nastanek infekcije in razvoj patoloških procesov (Benčina, 2002). Najbolj patogeni ptičji mikoplazmi sta *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, ki povzročata boleznii perutnine in sta razširjeni po vsem svetu. Pri obeh hemaglutininske različice kodirajo velike družine sorodnih genov, od katerih se v določenem času izraža le en gen. Gen za hemaglutinin (*vlhA*) se je iz genoma *M. synoviae* prenesel v genom *M. gallisepticum*. Pri sevu R so v genomu 3 kopije gena *vlhA*, pri vakcinalnem sevu F pa le 1 kopija. *M. synoviae* ima le en komplet gen *vlhA*, njegove antigenske in funkcionalne različice pa kodira okoli 70 psevdogenov, ki se v procesu genske konverzije lahko rekombinirajo in nadomestijo del prej izraženega *vlhA* gena. S pomočjo hemaglutininov se *M. gallisepticum* in *M. synoviae* pritrdita na celične receptorje, ki vsebujejo ostanke sialične kisline. Obe vrsti invadirata kokošje celice, kar lahko stopnjuje bolezenske procese. Njuni hemaglutinini so lipoproteini, v okuženih pticah povzročijo močan protitelesni odgovor, ki pa običajno ne more eliminirati okužbe. Gen za nevraminidazo (kodira 110 kDa protein) se je iz genoma *M. synoviae* prenesel v genom *M. gallisepticum*. Nevraminidaza desializira tudi serumske glikoproteine (tudi IgG in transferin), ki imajo sia ( $\alpha$  2-6) gal vez in glikoproteine sluzi sapnika, ki so sializirani s sia ( $\alpha$  2-3) gal vezjo. Mutacija v genu *M. synoviae*, ki inaktivira nevraminidazo *M. synoviae* je povezana z nesposobnostjo *M. synoviae*, da okuži traheje kokoši (Berčič in sod., 2011). Tudi vnos mutacije v gen za nevraminidazo *M. gallisepticum* (sev R) je močno znižala sposobnost njegove kulture za okužbo piščančjega sapnika. Nevraminidaze pri okuženih pticah povzročijo nastanek specifičnih protiteles, vendar imunski odgovor ni tako močan kot tisti proti hemaglutininu. Ker nevraminidaza desializira Fc del kokošjih IgG to lahko privede do pojava revmatoidnega faktorja (avtoprotiteles proti Fc delu), ki se pojavi pri ~50 % kokoši, ki so okužene z *M. synoviae*. Očitno je, da hemaglutinin in nevraminidaza igrata ključno vlogo v interakcijah *M. gallisepticum* in *M. synoviae* z gostitelji, ki jih okužujeta.

V zadnjih letih smo raziskovali hemaglutinine in nevraminidaze patogenih pasjih mikoplazem *M. canis* in *M. cynos*. Prva povzročateljica vnetja urogenitalnih organov, *M. cynos* pa okužuje dihalne organe in povzročateljica pljučnice. Opisali smo hemaglutinin HapA *M. cynos* (Kastelic in sod., 2015). To je lipoprotein, ki ga v genomu *M. cynos* kodira okoli 20 sorodnih genov, ki so lahko v gručah kot tandemske ponovitve podobnih sekvenc. HapA je zelo imunogen za okužene pse, specifična protitelesa smo ugotovili pri ~50 % psov. *M. cynos* sintetizira antigenske različice HapA in to ji omogoča izogibanje imunskemu odgovoru gostitelja. Hemaglutinin *M. canis* HacA je ~5× večji od HapA (mol. masa 220-250 kDa) in ga kodira en sam gen, ki se izraža variabilno in to vpliva na sposobnost hemaglutinacije. Nasprotno od *M. cynos*, *M. canis* ne hemaglutinira konjskih in kravjih eritrocitov. *M. canis* in *M. cynos* sintetizirata nevraminidaze z močno aktivnostjo, ki pa se lahko zelo razlikuje med njunimi sevi. Nevraminidaza *M. cynos* je velika ~110 kDa, nevraminidaza *M. canis* pa ~130 kDa. Obe dobro desializirata glikoproteine z vezjo sia ( $\alpha$  2-3) gal. Slabo pa desializirata

vez sia ( $\alpha$  2-6) gal na transferinu oz. na pasjih IgG (Fc del).

Glede na rezultate preiskav sklepamo, da hemaglutinini in nevraminidaze predstavljajo pomembne dejavnike pri okužbah perutnine in psov s patogenim mikoplazmami. Omogočajo nastanek okužbe in posledično patološke procese.

Benčina D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology* 2002; 31: 535-547.

Berčič R.L, Cizelj I, Dušanić D, et al. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathology* 2011; 40, 3: 299-308.

Kastelic S, Cizelj I, Narat M, et al. Molecular characterization of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Veterinary Microbiology* 2015; 175: 35-43.

## Haemagglutinins and neuraminidases of pathogenic *Mycoplasma* species

Similarly as is the case in certain viruses, e.g. influenza A virus, in some pathogenic mycoplasmas their haemagglutinins and neuraminidases act as crucial factors for infection onset and development of pathological processes (Benčina, 2002). Among the most pathogenic are avian mycoplasmas *M. gallisepticum* and *M. synoviae* that cause disease in domesticated birds and are spread all over the world. Their haemagglutin variants are encoded by large families of related genes. However, in a given time frame only one gene is expressed. Haemagglutinin gene *vlhA* was transferred from *M. synoviae* to *M. gallisepticum* genome. In strain R there are 3 gene copies of *vlhA* but only 1 copy is present in the genome of vaccinal strain F. *M. synoviae* possesses only one complete *vlhA* gene, that is antigenically and functionally variable due to the action of app. 70 pseudogenes, that can substitute parts of expressed *vlhA* genes through the process of gene conversion and recombination. Haemagglutinins enable *M. gallisepticum* and *M. synoviae* to bind to cell receptors that contain sialic acid residues. Both species can invade chicken cells which enhances pathological processes. Haemagglutinins of avian mycoplasmas are lipoproteins capable of evoking strong antibody response in diseased bird, which does not eliminate infection. Neuraminidase gene (coding a 110 kDa protein) was also transferred from *M. synoviae* to *M. gallisepticum* genome. Neuraminidase can desialylate serum glycoproteins (among others IgG and transferrin) with sia ( $\alpha$  2-6) gal bond and tracheal mucus glycoproteins containing sia ( $\alpha$  2-3) gal bond. Mutation in *M. synoviae* gene, causing an inactivation of neuraminidase function is correlated to its ability to cause tracheal infection (Berčič et al., 2011). Introducing mutation into *M. gallisepticum* strain R neuraminidase gene has significantly reduced its ability to cause chicken tracheal infection. In infected birds neuraminidase causes production of specific antibodies, but immune response elicited is weaker than against haemagglutinin. Neuraminidase is capable of desialylation of Fc part of chicken IgG, which in turn leads to the emergence of rheumatoid factor (autoantibodies against Fc part). This phenomenon was observed in ~50 % of chickens infected with *M. synoviae*. It is clear that haemagglutinin and neuraminidase play a crucial role in *M. gallisepticum* and *M. synoviae* interactions with their hosts.

In recent years we have been researching haemagglutinins and neuraminidases of pathogenic canine mycoplasmas *M. canis* and *M. cynos*. The first causes urogenital tract infections and *M. cynos* causes respiratory tract infections and severe pneumoniae. We

have reported that HapA, haemagglutinin of *M. cynos* is a lipoprotein, encoded by a gene family of app. 20 genes present in the genome as tandem repeats of similar sequences (Kastelic et al., 2015). HapA is highly immunogenic for infected dogs, specific antibodies were present in ~50 % of examined dogs. *M. cynos* synthesizes antigenic variants of HapA which enables evasion of host immune responses. Haemagglutinin HacA of *M. canis* is ~5× larger than HapA (220-250 kDa). It is encoded by a single gene, whose variable expression causes differences in strains haemagglutination ability. Contrary to *M. cynos*, *M. canis* does not haemagglutinate cow or horse erythrocytes. *M. canis* and *M. cynos* synthesize neuraminidase with strong enzymatic activity, that varies among strains. Neuraminidase of *M. cynos* has ~110 kDa, that of *M. canis* ~130 kDa. Both can effectively desialylate glycoproteins with sia (α 2-3) gal bond. On the other hand, they are not as effective with desialylation of sia (α 2-6) gal bond present on tranferrin and canine IgG (Fc part).

Based on investigation results we can conclude, that haemagglutinin and neuraminidases represent important factors regarding poultry and canine infections. They enable the start of infection and aid in the development of pathological processes.

Benčina D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology* 2002; 31: 535-547.

Berčič R.L, Cizelj I, Dušanić D, et al. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathology* 2011; 40, 3: 299-308.

Kastelic S, Cizelj I, Narat M, et al. Molecular characterization of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Veterinary Microbiology* 2015; 175: 35-43.

# EVALUATION OF HUMORAL IMMUNITY AND PRODUCTION PARAMETERS AFTER VACCINATION WITH Live ATTENUATED VACCINES AGAINST NEWCASTLE DISEASE IN COMMERCIAL BROILERS AND LAYERS

Alenka Ballarin-Perharić<sup>1\*</sup>, Davor Janković<sup>1</sup>, Rahela Juršić Cizerl<sup>2</sup>, Marjetka Podlesnik<sup>3</sup>, Olga Zorman Rojs<sup>4</sup>, Uroš Krapež<sup>4</sup>, Brigita Slavec<sup>4</sup>, Petra Zrimšek<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genera Inc, Croatia; <sup>2</sup>Perutnina Ptuj, <sup>3</sup>Veterinary Station Laško, <sup>4</sup>Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Institute for Healthcare of Poultry, Slovenia

alenka.aallarin-aerharic@genera.hr

The trials were conducted to evaluate humoral immunity and production parameters after vaccination with live vaccines against Newcastle disease in commercial broilers and layers in field conditions. For this purpose, 18-day-old commercial broilers were vaccinated with Avishield® ND and ND vaccine with cloned LaSota strain by oral administration of one dose per bird via drinking water. Layers were vaccinated with the same vaccines four times by spray administration; first vaccination was at the age of 3 weeks, and then revaccinations at 8, 16 and 24 weeks of age. The performance of the tested vaccines in commercial broilers was assessed by measurement of serological response, body weight, feed conversion and observation of clinical signs, while in commercial layers serological response, clinical signs, egg production and body weight were monitored. No difference was found in the level of antibodies against NDV between the groups of commercial broilers immunized with two vaccines three weeks after vaccination nor there were variations in the mortality and culling rate. The achieved overall production results were satisfactory and comparable between both groups. In trial with commercial layers HI - antibody titres after 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> vaccination remained above protective threshold and did not differ significantly from the titre of maternally derived antibodies measured prior to vaccination. Three weeks after the 4<sup>th</sup> vaccination no significant difference in HI titre was observed between the groups. In group vaccinated with Avishield® ND no adverse events after vaccinations were observed during the whole observation period, while in the group vaccinated with cloned LaSota strain mild respiratory clinical signs were noticed one week after the first vaccination. Average body weight was comparable in both groups.

## Introduction

Newcastle disease (ND) is highly contagious viral disease of poultry and causes the significant economic burden to the poultry industry. It is caused by pathogenic strains of avian paramyxovirus type 1 (APMV-1), a highly contagious avian disease agent, transmissible to poultry and over 250 other species of birds. Mortality from infection with virulent strains of ND virus (NDV) can reach 100 percent in unprotected poultry flocks.

Vaccination for ND is routinely practiced in countries where virulent strains of the NDV are endemic and in countries where virulent strains do not exist but ill-timed infection by a low virulent field strain may have significant economic consequences for the producer.



For the vaccination live attenuated and/or inactivated vaccines are most commonly used.

In this study, performance of the Avishield® ND, live attenuated vaccine containing lentogenic LaSota strain, was compared to the performance of the well-established ND vaccine based on the cloned LaSota strain.

## Material and methods

### *Chickens*

A total of 77 600 commercial broilers (Ross 308) with the history of vaccination of parent stock against NDV were included in the trial. One half of the stock received Avishield® ND and the rest received cloned LaSota strain. Broilers were divided into four groups and each group was housed separately. All houses had slatted floors and chickens were housed on deep litter. A total of 13.850 commercial layers of Lohmann Brown were included in layer trial, separated in two groups; 6.860 vaccinated with Avishield® ND and 6.990 with cloned LaSota strain. During the rearing period chickens were housed on deep litter and after moving to production farms, layers from the group vaccinated with Avishield® ND were housed in a farm with enrichment cage system (1.800 layers), and layers vaccinated with cloned LaSota strain were housed on slatted floor (1.000 layers in production period).

### *Vaccines*

Avishield® ND and commercially available ND vaccine with cloned LaSota strain were used for vaccination of chickens.

### *Collection and analysis of data*

To establish the level of residual maternal antibodies against NDV, 20 blood samples from each house were taken before the vaccination by wing vein puncture. To determine the level of antibody response after vaccination the same number of blood samples were taken at the end of fattening period for broilers, and three weeks after each vaccination for layers. Serological response against NDV was measured by inhibition haemagglutination (IHA) method using 4 HA units of antigen. Clinical observation, feed consumption and body weight of the broilers were monitored and, for layers, egg production was recorded. General linear model (GLM) and t-test were used to analyse data on antibody titers. Data were analysed using software IBM SPSS Statistics 17.0; values of  $P < 0.05$  were considered significant for all analyses.

## Results and discussion

Serological responses of broilers vaccinated against NDV are presented in Figure 1.

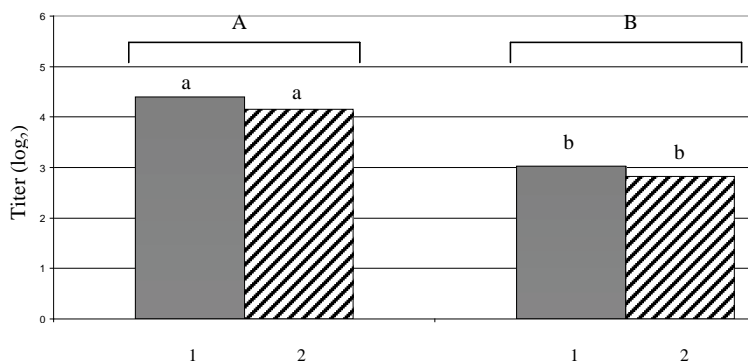


Figure 1: Titers of specific antibodies against NDV on the day of vaccination and before slaughter for commercial broilers

Values marked by different lowercase letters above the columns are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Legend: A: titers of antibodies ( $\log_2$ ) on the day of vaccination; B: titers of antibodies ( $\log_2$ ) before slaughter

Groups: 1: Vaccine Avishield® ND; 2: ND vaccine with cloned LaSota strain

Average production results of the broilers vaccinated against NDV are presented in Table 1.

Table 1: Average production results according to tested vaccine for broilers

Parameter	Group Avishield® ND	Group ND vaccine with cloned LaSota strain
Average age at final slaughter	39,5	39
Average body weight at final slaughter	2,33	2,26
Feed conversion	1,80	1,79
Production index - PI	305	304

Serological responses of layers vaccinated against NDV are presented in Figure 2.

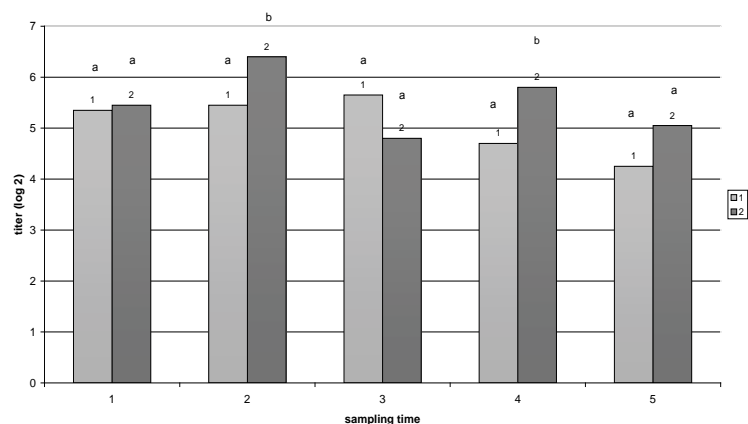


Figure 2: Comparison of titers of antibodies against NDV before vaccination (age 21 days) and 3 weeks after each vaccination (age 42, 77, 133, 188/189 days) according to tested vaccines for layers

Legend: Columns marked by numbers 1 and 2 correspond to different vaccines: 1: Vaccine Avishield® ND; 2: ND vaccine with cloned LaSota strain. Sampling time: 1: age 21 days (before vaccination); 2: age 42 days (3 weeks after 1<sup>st</sup> vaccination); 3: age 77 days (3 weeks after 2<sup>nd</sup> vaccination); 4: age 133 days (3 weeks after 3<sup>rd</sup> vaccination); 5: age 188 (189) days (3 weeks after 4<sup>th</sup> vaccination)

Values marked by different lowercase letters above the columns are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Average production results of layers vaccinated against NDV are presented in Table 3.

Table 2: Production results of layers vaccinated against NDV obtained in the rearing period

Parameter	Group Avishield® ND	Group ND vaccine with cloned LaSota strain
Average age of pullets when moved to the production facilities	134,6 days	126,3 days
Mortality and culling in the rearing period	3,6%	2,9%
Average feed consumption per bird	7,5227 kg	6,9545 kg

Egg production of layers vaccinated against NDV using Avishield® ND is presented in Figure 3.

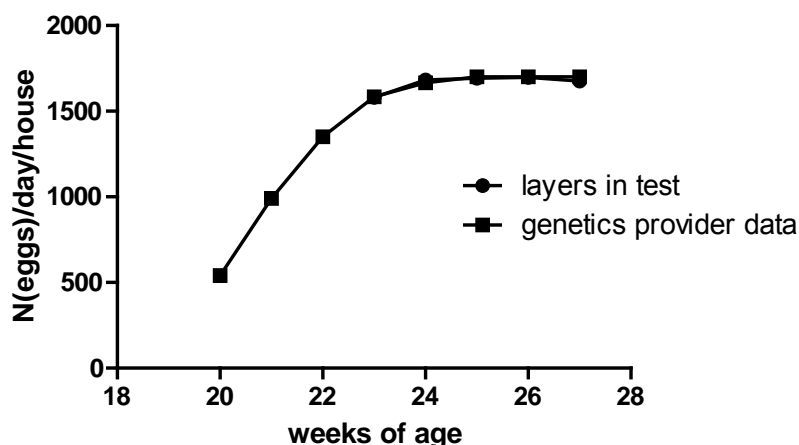


Figure 3: Egg production of layers vaccinated with Avishield ND, arrow indicates the day of vaccination

The level of maternal antibodies in broilers before vaccination did not differ between the groups ( $P > 0.05$ ). No difference between the groups immunized with two vaccines was found in the level of antibodies against NDV three weeks after vaccination ( $P > 0.05$ ). During the whole period of the trial chickens of both groups were in good health condition and no adverse effect were observed. No difference in body weight of chickens according to tested vaccines was observed ( $P > 0.05$ ). The achieved overall production results were good and comparable between the groups.

In both layer flocks relatively high titre of maternal derived antibodies against NDV were detected and did not differ significantly among flocks. Three weeks after the 4<sup>th</sup> vaccination no statistically significant difference was observed between the groups. Average HI-antibody titres against NDV were above  $4 \log_2$  in both groups during the whole test period, which indicated appropriate protection. In group vaccinated with Avishield® ND no adverse events after vaccinations were observed during the whole observation period. In the group vaccinated with cloned LaSota strain mild respiratory clinical signs were noticed one week after the first vaccination. During the whole study period the mortality was low in both groups. Average body weight was comparable in both groups. Egg monitoring in group vaccinated with Avishield® ND was observed from vaccination in production period and 28 days post vaccination. No negative effect on egg production or egg quality was seen. In

group vaccinated with cloned LaSota strain at the age of 24 weeks a drop in egg production was detected and infection with avian infectious bronchitis virus and *Mycoplasma synoviae* was confirmed (data not shown).

## Conclusions

Both tested ND vaccines induced humoral immunity above estimated protective level. At the end of the observation period there were no differences in serological response between the Avishield® ND and ND vaccine with cloned LaSota strain. Both vaccines were shown to be safe for administration and expected production parameters were met in all test groups. Repeated vaccination against ND using live attenuated vaccines during production period did not impact egg production nor egg quality.



## **Nove tehnologije v veterinarstvu**

New technologies in veterinary  
medicine

---

## **ANSES *Listeria monocytogenes* NATIONAL & EUROPEAN PROGRAMS: A ROAD MAP TOWARD, THE USE MOLECULAR TYPING FOR FOOD SAFETY**

Benjamin Felix\*, D. Michelon, B. Lombard, S. Roussel

French Agency for food, environmental and occupational health & Safety (ANSES), European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*), Maisons-Alfort, France

Benjamin.FELIX@anses.fr

Since 2006, EURL *Lm*, hosted by Anses Laboratory for food safety, with financial support of European Commission (DG SANTE), coordinates and manages a network of 37 National Reference Laboratories (NRLs) in 29 EU Member States. Most of these NRLs are in charge of typing of strains isolated from food, environment and animals.

In the past few years, the NRLs have reinforced and consolidated their typing activities, by participating to annual EURL training sessions, workshops and Proficiency Testing trials (PT trials)<sup>1,2</sup>. In 2014, the EURL *Lm* contracted by the EFSA published a harmonized PFGE and PFGE profile interpretation standard operating procedures (SOPs)<sup>3</sup>. During PT trials and based on this SOPs, 21 NRLs in 2014 and 21 in 2016, were evaluated for PFGE. In 2016 nine NRLs were evaluated for Multi-locus sequence typing (MLST). As a logic evolution the EURL *Lm* has set up a European molecular typing database, EURL *Lm* DB, to centralize and share within the NRL network PFGE profiles of food strains, as well as associated epidemiological data<sup>4</sup>. The EURL *Lm* DB has strongly contributed to the recent development of a joint ECDC-EFSA database of molecular typing data gathering human and non-human circulating *Lm* strains. The EURL *Lm* is part of steering committee of this new database. In the coming months, EURL will be in charge of curation and cluster investigation for the non-human *Lm* strains.

The PFGE applied on *Lm* is a 20 years old method. To date it remains the reference method for the molecular typing of *Lm*, invaluable for the routine surveillance of food and clinical strains<sup>5</sup>. In the coming years, the PFGE will be soon replaced by WGS technologies, this one having a higher, potential for harmonisation, genetic relevance and discriminatory power. For WGS development, the Anses laboratory for food safety and the EURL *Lm* focused their research activities on the genetic structure of the *Lm* strain populations circulating in the food production. This action took place in the framework of several national and European projects. We will put emphasis here on a project combining PFGE and WGS, for a better understanding *Lm* persistence in food processing environment. This project involves the Veterinary faculty of Ljubljana and the Anses.

EFSA : European Food Safety Authority

ECDC : European Center for Disease prevention and Control

<sup>1</sup>: Felix, B., *et al* (2012). Foodborne Pathog. Dis. 9, 719-726.

<sup>2</sup>: Felix, B *et al* (2013). Foodborne Pathog. Dis. 10, 873-881.

<sup>3</sup>: Roussel, S. *et al* (2014). EFSA supporting publication, EN-0702, 81 pp.

<sup>4</sup>: Felix, B., *et al* (2014). J Microbiol. Methods 104, 1-8.

<sup>5</sup> : Moura, A., *et al* (2016). Nat Microbiol 2, 16185.

# NOVEJŠE DIAGNOSTIČNE METODE V VETERINARSKEM LABORATORIJU

Matjaž Ocepek\*, Ivan Toplak, Darja Kušar

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Ljubljana, Slovenija

matjaz.ocepek@vf.uni-lj.si

Sodobni diagnostični in raziskovalni laboratoriji imajo na voljo opremo in znanje za izvajanje klasičnih metod v kombinaciji z molekularnimi in serološkimi ter nekaterimi drugimi metodami. Povečevanje števila vzorcev in krajšanje razpoložljivega časa od prejema vzorca do diagnoze ter hiter tehnološki razvoj stalno sili laboratorije k nadgrajevanju in optimizaciji postopkov. Med novejšimi diagnostičnimi metodami se najhitreje razvijajo molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji nukleinskih kislin in pomnoževanju tarčnega odseka. V primerjavi s klasičnimi so molekularne metode običajno hitrejše, predvsem pa omogočajo analizo tudi tistih mikrobov, ki jih v laboratorijskih pogojih ne moremo gojiti oz. rastejo zelo počasi. Med molekularnimi metodami je najbolj uveljavljena metoda PCR in njene različice, npr. digitalni PCR kot ena zadnjih, ter sekvenciranje. Po prvi generaciji sekvenciranja po Sangerju se v zadnjem desetletju vse bolj uveljavlja sekvenciranje naslednje generacije (NGS), ki ponuja najbolj celovite diagnostične in raziskovalne odgovore. Metoda NGS postaja vedno bolj cenovno dostopna in se lahko izvaja tudi v okviru posebej specializiranih laboratorijev, seveda ob ustrezni računalniški podpori. Pri masovnem paralelnem sekvenciranju namreč pridobimo velike količine podatkov o odčitanih nukleotidnih zaporedjih, ki imajo uporabno vrednost šele po ustrezni analizi s specializiranimi orodji bioinformatike. Večina teh programov se poganja v operacijskem sistemu Linux, na voljo pa so različni komercialni paketi, ki jih zaznamuje raznolikost, potreba po predznanju uporabnikov in nezanemarljiv finančni vložek. Med novejšimi metodami v rutinsko uporabo prihaja tudi masna spektrometrija MALDI-TOF, ki temelji na analizi celičnih proteinov in je cenovno dostopna metoda za hitro in rutinsko identifikacijo bakterijskih izolatov v kliničnih mikrobioloških laboratorijih. Uveljavljajo se tudi metode, ki omogočajo hkratno analizo velikega števila izraženih lastnosti. Med te uvrščamo fenotipske mikromreže, ki so v osnovi avtomatizirani biokemijski testi na mikrotitrskih ploščah za sledenje skoraj 2000 različnih fenotipov mikrobnih celic, ter avtomatizirane multiparametrične serološke teste. Vpeljava najnovejših metod laboratoriju zagotavlja konkurenčnost na trgu ter hitrejše pridobivanje najbolj zanesljivih in ultimativnih odgovorov na diagnostična ali raziskovalna vprašanja.

Ključne besede: molekularne metode; sekvenciranje naslednje generacije (NGS); masna spektrometrija MALDI-TOF

## New diagnostic methods in veterinary laboratories

Modern diagnostic and research laboratories have the equipment and expertise to perform analyses by traditional methods in combination with molecular and serological methods, in addition to some others, that are forced to upgrading and optimization due



to the increasing number of samples, high time-to-result demand and rapid technological development. Molecular methods, based on the isolation of nucleic acids, are most rapidly developing among the modern diagnostic methods. In comparison with conventional methods, molecular methods are faster and, most importantly, enable also the analysis of microbes that cannot grow under laboratory conditions or grow very slowly. Among molecular methods, PCR with its variants, like digital PCR as one of the latest, and sequencing are the most commonly used. After sequencing of the first-generation (Sanger), the next-generation sequencing (NGS) has been gaining popularity in the last decade as offering the most comprehensive diagnostic and research answers. NGS is becoming more affordable and can be implemented also in smaller laboratories, with appropriate information-technology support. Namely, with the massive parallel sequencing a large number of data is collected, having a practical value only after proper analyses with the specialized bioinformatic tools. Most of these programs are powered by the Linux operating system and various commercial packages are available, characterized by their versatility, need for user-knowledge and considerable financial investment. Among the newer methods, the MALDI-TOF mass spectrometry, based on the analysis of cell proteins, is also coming into the routine use. It is a method that is affordable for rapid and routine identification of bacterial isolates in clinical microbiological laboratories. In addition, methods that enable simultaneous analysis of a large number of expressed characteristics are also being promoted. These include the phenotypic microarrays, which are basically the automated biochemical tests performed in microtiter plates for tracking nearly 2000 different phenotypes of microbial cells, and the automated multiparametric immunoassay systems. The introduction of the latest laboratory methods ensures competitiveness to the laboratory at the market and more rapid acquisition of the most reliable and ultimate answers to the diagnostic or research questions.

Key words: molecular methods; next-generation sequencing (NGS); MALDI-TOF mass spectrometry

# PRVA UGOTOVITEV REKOMBINANTNIH SEVOV VIRUSOV PED PRI PRAŠIČIH Z DRISKO V SLOVENIJI

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Darja Kušar<sup>1</sup>, Bojan Papić<sup>1</sup>, Tonček Gider<sup>2</sup>, Marina Štukelj<sup>3</sup>, Urška Kuhar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana <sup>2</sup>Panvita, Veterina d.o.o., Murska Sobota, <sup>3</sup>Klinike za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Prvi uradno potrjen primer okužbe z virusom prašičje epidemične driske (PED) smo pri prašičih v Sloveniji dokazali na začetku leta 2015. Okužba z virusom PED povzroča vodeno drisko in dehidracijo, pri sesnih pujskih pa tudi visoko smrtnost. Prašičji respiratorni koronavirus (PRCV) je endemično prisoten v večini rej prašičev in redko povzroča blage respiratorne okužbe. V izvedeni študiji smo pri 18 PEDV pozitivnih vzorcih sekvencirali produkte PCR po Sangerju in v dveh pozitivnih vzorcih posumili na prisotnost rekombinantnega seva virusa. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije Ion Torrent smo določili celotni genom virusa PED SLOreBAS/2015 (28.021 nukleotidov). Na poziciji genoma od 20.865 do 21.255 v dolžini 390 nt smo pri tem sevu ugotovili del genoma PRCV s 97% identičnostjo s sevom Italy/213306/2009 in le 88% identičnostjo s PED SINDEL sevi, kar potrjuje, da gre za rekombinantni sev virusa. Drugi rekombinantni sev smo potrdili v še eni reji v marcu leta 2016. Ti novi rekombinantni sevi ne predstavljajo samo nevarnosti za nastanek bolj patogenih sevov za prašiče, povzročajo tudi težave v diagnostiki in lahko predstavljajo potencialno nevarnost za človeka, zato novih koronavirusnih okužb pri prašičih ne bi smeli podcenjevati.

Ključne besede: virus prašičje epidemične diareje; rekombinantni sevi; Ion Torrent sekvenciranje, diagnostika

## Uvod

*Virus prašičje epidemične driske (PEDV) in prašičji respiratorni koronavirus (PRCV) sta uvrščena v rod Alphacoronavirus, družine Coronaviridae. Genom obeh virusov je pozitivno polarna molekula RNA, ki je velika približno 28.000 nukleotidov. Koronavirusi se evolucijsko prilagajajo gostitelju s spreminjanjem genoma, ki je posledica akumuliranja točkovnih mutacij in homolognih rekombinacij med sorodnimi virusi. Genoma PEDV in PRCV se na nivoju nukleotidnega zaporedja med seboj razlikujeta za 40%. Okužba prašičev z virusom PED povzroča vodeno drisko, dehidracijo pri vseh kategorijah prašičev, pri sesnih pujskih pa tudi visoko smrtnost. PRCV se je v 80-ih letih prejšnjega stoletja prvič pojavil kot mutanta virusa kužnega vnetja želodca in črevesja (TGE) in pri prašičih povzroča le blage okužbe dihal. Hitro širjenje PRCV je povzročilo izginotje TGE, medtem ko je PRCV v prašičjih rejah endemično prisoten. Med leti 2010 in 2012 so okužbe z visoko patogenimi sevi virusi PED zaznali na Kitajskem, v letih od 2013 do 2014 v ZDA, Kanadi in Mehiki, od leta 2014 naprej pa jih zaznavamo tudi v Evropi. Prvi uradno potrjen primer okužbe z virusom PED smo dokazali v Sloveniji za začetku leta 2015 (1). V začetku leta 2016 so raziskovalci iz Italije (2) in Nemčije (3) poročali o ugotovitvi dveh rekombinantnih sevov med PEDV in PRCV, ki so jih dokazali v blatu prašičev z drisko. Zaradi teh dveh predhodnih poročil smo postali pozorni na morebiten pojav rekombinantnih sevov tudi pri nas.*

## Material in metode

V 20 rejah pitancev, kjer je veterinar na podlagi kliničnih znakov hude driske postavil sum na PED, smo iz boksov obolelih prašičev skupno vzorčili 84 vzorcev blata. Iz vzorcev blata smo v gojišču RPMI pripravili suspenzije, iz katerih smo s kitom QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija) izolirali nukleinske kisline. Za dokazovanje virusov PED oziroma TGE in hkrati za razlikovanje med tema dvema virusoma smo uporabili metodo RT-PCR v realnem času (Virotype PEDV/TGEV, Qiagen, Nemčija), ki specifično pomnožuje odsek gena, ki kodira protein S. V pozitivnih vzorcih smo s klasično metodo RT-PCR pomnožili 390 nukleotidov dolg odsek gena v virusnem genomu, ki kodira od RNA odvisno polimerazo RNA in produkte PCR sekvencirali po Sangerju. Vzorec blata, v katerem smo posumili na prisotnost rekombinantnega virusa, smo uporabili za sekvenciranje z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) Ion Torrent in določili celotni genom virusa PED. Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski banki s pomočjo programov BLAST in DNASTAR

## Rezultati

V 18 vzorcih smo s specifično metodo PCR v realnem času dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PED, dobljene vrednosti Ct so bile med 16 in 33. Filogenetska primerjava nukleotidnega zaporedja 18 pozitivnih vzorcev v dolžini 390 nukleotidov gena za virusno polimerazo je pri 16 pozitivnih vzorcih pokazala 99,7 do 100% medsebojno identičnost in od 99,0 do 99,7% identičnost s sevi PED SINDEL, ki so bili ugotovljeni v zadnjih dveh letih v Evropi. V dveh vzorcih smo ugotovili prisotnost nukleinske kisline PRCV s 97,4% identičnostjo sevu PRCV ISU1-2006 (DQ811789), ostalih 16 pozitivnih vzorcev pa je kazalo le 66,2 do 66,7% identičnost nukleotidnega zaporedja. Na podlagi te ugotovitve smo posumili, da se v teh dveh pozitivnih vzorcih nahaja rekombinantni sev virusa PED/PRCV. Pozitivnemu vzorcu PED SLOreBAS/2015 smo določili zaporedje celotnega genoma virusa, ki znaša 28.021 nukleotidov. Ugotovili smo, da je sev SLOreBAS/2015 99,7% identičen sevu FR/001/2014 iz Francije. V genomu seva SLOreBAS smo na poziciji od 20.865 do 21.255 v dolžini 390 nt ugotovili del genoma PRCV z 97% identičnostjo z rekombinantnim sevom Italy/213306/2009 in le 88% identičnostjo s SINDEL sevi, kar potrjuje da gre za rekombinantni sev virusa. Oba rekombinantna seva smo ugotovili v dveh različnih rejah pri prašičih s kliničnimi primeri driske in sumom na PED, v prvi reji v novembru leta 2015 in v drugi reji v marcu leta 2016.

## Razprava

V Slovenijo se uvaža veliko število živih prašičev iz različnih držav, brez poznanega zdravstvenega statusa. Prašiči prihajajo iz velikega števila različnih rej, kar povečuje možnosti vnosa novih sevov in nastanka novih kombinacij virusov. Zaradi kroženja genetsko dveh različnih virusov (PRCV/PEDV) v rejah nastajajo tudi novi rekombinantni sevi, prav tako se lahko ti sevi vnesejo z uvozom prašičev. Ti novi rekombinantni sevi pa ne predstavljajo samo nevarnosti za nastanek bolj patogenih sevov za prašiče, povzročajo tudi težave v diagnostiki in lahko predstavljajo potencialno nevarnost za človeka, saj je v preteklosti bilo že večkrat dokazano, da so koronavirusne okužbe človeka (MERS in SARS) bile posledica prenosa iz živali. Zaradi tega ima lahko pomanjkljivo zatiranje in podcenjevanje pojavljanja novih koronavirusnih okužb (PEDV) pri prašičih tudi daljnosežne posledice. V Sloveniji smo v tej študiji prvič dokazali prisotnost rekombinantnih sevov virusov PED.

## Reference

1. Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, Kušar D, Papić B, Koren S, Toplak N. Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016; 4(2) e01725-15.
2. Boniotti MB, Papetti A, Lavazza A et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 2016; 21: 83–87.
3. Akimkin V, Beer M, Blome S et al. New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany 2012. *Emerg Infect Dis* 2016, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.160179>.

## First detection of recombinant strains of PEDV in pigs with diarrhea in Slovenia

At the beginning of 2015 the first officially confirmed case of infection with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was detected in pigs in Slovenia. PEDV infection causes watery diarrhea, dehydration and a high mortality rate in piglets. Porcine respiratory coronavirus (PRCV) is endemically present in the majority of pig holdings and causes mild respiratory infection. This study was conducted first by Sanger sequencing of 18 PEDV PCR positive samples and two of them were suspected for the presence of a recombinant virus strains. By using the method of the next generation sequencing (Ion Torrent) the complete genome sequence of the virus SLOreBAS PED/2015 (28.021 nucleotides) was determined. In the position of the genome from 20.865 to 21.255 (390 nt) a part of the PRCV genome with 97% identity to the strain of Italy/213306/2009 and only 88% identity to PEDV SINDEL strains was found, confirming the identification of a recombinant virus strain. The second recombinant strain was confirmed in another pig herd in March 2016. These new recombinant strains not only pose a threat for the emergence of more pathogenic strains for pigs and cause problems in diagnostics, but may also represent a potential danger to humans, thus the new coronavirus infections in pigs should not be underestimated.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; recombinant strains Ion Torrent sequencing; diagnostics

# SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS): TESTIRANJE VZORCEV BLATA PRAŠIČEV Z DRISKO

Urška Kuhar\*, Darja Kušar, Bojan Papić, Ivan Toplak

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

urska.kuhar@vf.uni-lj.si

Tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (NGS) predstavljajo velik preboj v diagnostiki kužnih bolezni, saj omogočajo dokazovanje in tipizacijo znanih patogenih mikroorganizmov, dokaz novih patogenov, hkratni dokaz več patogenov v vzorcu, določanje celih genomov in metagenomske raziskave. Namen naše raziskave je bil ugotoviti vrednost NGS pri odkrivanju patogenov v kliničnih vzorcih, in sicer v vzorcih blata prašičev z drisko. Analizirali smo štiri vzorce blata obolelih prašičev s kliničnimi znaki hude driske. Iz suspenzij blata prašičev smo izolirali celokupne nukleinske kisline in jih uporabili za pripravo knjižnic NGS ter jih sekvencirali s tehnologijo Ion Torrent. Skupno smo 396.486 odčitkov, dolgih v povprečju 129 nukleotidov, umestili v 1.537 sosek. 786 sosekam smo pripisali njihovo taksonomijo na nivoju vrste ali rodu, medtem ko 751 sosekam nismo uspeli pripisati taksonomije. V vseh štirih preiskovanih vzorcih smo potrdili prisotnost virusa prašičje epidemične diareje (PED). V dveh vzorcih smo ugotovili tudi prisotnost virusa iz rodu *Picobirnavirus* in prašičjega astrovirusa. V enem vzorcu je bil prisoten tudi virus iz rodu *Torovirus*. Poleg virusnih nukleotidnih zaporedij smo v vzorcih ugotovili tudi prisotnost bakterijskih zaporedij, zaporedij arhej, nematodov, protistov in ameb. Naši rezultati potrjujejo, da je NGS močno orodje za diagnostiko povzročiteljev kužnih bolezni, ki omogoča hkratno detekcijo več patogenov v kompleksnih vzorcih.

Ključne besede: sekvenciranje naslednje generacije (NGS); klinični vzorci; diagnostika; naključno sekvenciranje

## Uvod

Trenutno sta molekularna testa, kot sta RT-PCR in RT-PCR v realnem času, najpogosteje uporabljena testa v diagnostiki virusnih okužb. Molekularni testi so hitri, relativno poceni, visoko specifični in bolj občutljivi kot klasična metoda izolacije virusa v celični kulturi. Nedavno razvite tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (NGS) predstavljajo velik preboj v veterinarski in humani diagnostiki kužnih bolezni. NGS med drugim omogoča dokazovanje in tipizacijo znanih patogenov, hkratni dokaz več patogenov v vzorcu, določanje zaporedja nukleotidov celotnih genomov in metagenomske raziskave. Pri naključnem sekvenciranju (angl. *shotgun sequencing*) gre za sekvenciranje vseh prisotnih nukleinskih kislin v vzorcu. Omenjen pristop nam omogoča določitev zaporedja genoma oz. odsekov genoma mikroorganizmov v kliničnih vzorcih neodvisno od predhodnega poznavanja njihove identitete oz. sestave mikrobne združbe v vzorcu. Za razliko od obstoječih metod pri NGS nismo omejeni s številom tarčnih patogenov, ki jih lahko vključimo v test. Prav tako pri metodi NGS nismo omejeni s poznavanjem raznolikosti tarčnih zaporedij, zato je ta metoda zelo uspešna tudi pri dokazovanju novih patogenov (1, 2). Namen naše raziskave je

bil ugotoviti uporabno vrednost NGS pri odkrivanju patogenov v kliničnih vzorcih, in sicer v vzorcih blata prašičev z drisko.

## Material in metode

Analizirali smo štiri vzorce blata obolelih prašičev s kliničnimi znaki hude driske, ki smo jih odvzeli iz rej pitancev, kjer je veterinar na podlagi klinične slike postavil sum na okužbo z virusom prašičje epidemične diareje (PED). Z metodo RT-PCR v realnem času (Virotype PEDV/TGEV, Qiagen, Nemčija) smo v teh vzorcih dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PED. Iz vzorcev blata smo pripravili suspenzijo v gojišču RPMI in izolirali nukleinske kisline s kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). Knjižnice RNA smo pripravili s kompletom Ion Total RNA Sequencing Kit v2. Za emulzijski PCR in obogatitev knjižnic smo uporabili komplet Ion PGM™ Template OT2 200. Koncentracijo in kvaliteto knjižnic NGS smo določali s kapilarno elektroforezo LabChip GX (Perkin Elmer, ZDA). Tako pripravljene knjižnice smo sekvencirali s tehnologijo Ion Torrent na platformi Ion PGM (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Odčitke smo sestavili v daljša zaporedja (soseske) s programom AssemblerSPAdes (3). S programom BLASTN smo nukleotidna zaporedja primerjali z zaporedji v podatkovni zbirki NCBI GenBank. S programom MEGAN5 (4) smo soseskam pripisali njihovo taksonomijo na podlagi taksonomske uvrstitve njim najbolj podobnim zaporedjem.

## Rezultati

Skupno smo 396.486 odčitkov, dolgih v povprečju 129 nukleotidov, sestavili v 1.537 sosesk. S programom MEGAN5 smo 786 (51,1 %) soseskam pripisali njihovo taksonomijo na nivoju vrste ali rodu, medtem ko 751 (48,9 %) soseskam nismo uspeli pripisati taksonomije. Rezultati so prikazani v Preglednici 1. V vzorcu 1 smo ugotovili prisotnost virusa PED in virusa, ki spada v rod *Picobirnavirus*. Preostale soseske so se uvrščale v 24 bakterijskih rodov. Prisotnost virusa PED smo ugotovili tudi v vzorcu 2. Poleg virusa PED so bili v omenjenem vzorcu prisotni tudi prašičji astrovirusi ter virusi iz rodov *Torovirus* in *Picobirnavirus*. Soseske, ki so se grupirale z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščale v 18 različnih bakterijskih rodov. Manjše število sosesk se je grupiralo z zaporedji gliv, arhej, protistov, ameb in nematodov. V vzorcu 3 smo prav tako ugotovili prisotnost virusa PED, prašičjega astrovirusa in virusa iz rodu *Picobirnavirus*. Soseske, ki so se grupirale z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščale v 38 različnih bakterijskih rodov. Poleg tega se je manjše število sosesk grupiralo z zaporedji arhej, nematodov, protistov in ameb. V vzorcu 4 smo ugotovili prisotnost samo enega virusa, in sicer virusa PED. Zaporedja, ki so se grupirala z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščala v 72 različnih bakterijskih rodov. Nekatere soseske so se grupirale tudi z zaporedji arhej, protozojev in nematodov.

## Razprava

V vseh štirih preiskovanih vzorcih, v katerih smo predhodno potrdili prisotnost virusa PED z metodo RT-PCR v realnem času, smo prisotnost virusa PED ugotovili tudi z metodo NGS. Rezultati potrjujejo, da lahko z novo tehnologijo NGS ugotovimo prisotnost patogenih mikroorganizmov tudi v tako kompleksnih vzorcih, kot je blato. Veliko število komenzalnih oziroma netarčnih mikroorganizmov v blatu ni onemogočalo detekcije patogenih mikroorganizmov, in sicer virusa PED. Poleg virusa PED smo ugotovili tudi

Preglednica 1: Rezultati in analiza odčitkov iz štirih vzorcev blata prašičev, sekvenciranih z NGS

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Skupaj
število odčitkov	108.188	66.194	83.567	138.537	396.486
povprečna dolžina odčitkov	120 bp	113 bp	124 bp	162 bp	129 bp
število sosesk	343	150	277	767	1.537
število sosesk s pripisano taksonomijo	219 (63,8 %)	67 (44,7 %)	140 (50,5 %)	360 (46,9 %)	786 (51,1 %)
število sosesk, ki jim nismo uspeli pripisati taksonomije	124 (36,2 %)	83 (55,3 %)	137 (49,5 %)	407 (53,1 %)	751 (48,9 %)

prisotnost virusov iz rodov *Torovirus* in *Picobirnavirus* ter prašičji astrovirus. Veliko število zaporedij nismo uspeli taksonomsko uvrstiti, kar kaže na veliko in še zelo slabo poznano raznolikost mikrobne združbe v blatu prašičev. Medtem ko smo pri molekularnih metodah, ki temeljijo na dokazovanju oziroma analizi zaporedij tarčnih odsekov genoma omejeni z raznolikostjo in nepoznavanjem tarčnega odseka, nam NGS omogoča tudi dokazovanje novih patogenov s še nepoznanim zaporedjem nukleotidov v genomu. Zaključimo lahko, da je NGS močno orodje, ki veliko obeta in bo v prihodnje pomembna tehnološka rešitev pri dokazu povzročiteljev kužnih bolezni in bo omogočila tudi hkratno dokazovanje večjega števila patogenov v kompleksnih vzorcih.

## Reference

1. Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. *J Clin Virol* 2015; 69: 96-100.
2. Radford AD, Chapman D, Dixon L, et al. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol* 2012; 93(9): 1853-68.
3. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 2013; 20(10): 714-37.
4. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, et al. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res* 2011; 21(9): 1552-60

## Next generation sequencing (NGS): testing of feces samples from pigs with diarrhea

Next-generation sequencing (NGS) technologies are a major breakthrough in the field of infectious disease diagnostics as they allow novel pathogen detection without prior sequence knowledge and enable simultaneous detection of multiple pathogens, whole genome studies and metagenome studies. The aim of this study was to determine the value of NGS in the detection of pathogens in clinical samples, namely diarrheic pig fecal samples. Fecal samples from four pigs with severe diarrhea were analyzed. NGS libraries were prepared from sample suspensions and used for Ion Torrent sequencing. Altogether, 396.486 reads were assembled into 1.537 contigs. Taxonomy units were assigned to 786 contigs, while 751 contigs remained unassigned. All four samples were positive for porcine epidemic diarrhea virus

(PED). In two samples, viruses from the genus *Picobirnavirus* and porcine astrovirus were also detected, while one sample was positive for the virus from genus *Torovirus*. In addition to viral sequences, sequences from bacteria, archaea, nematodes, Protista and amoebae were also detected in investigated samples. Based on these results, we can conclude that the NGS technology is a powerful tool for infectious disease diagnostics which enables us simultaneous detection of multiple pathogens in complex samples.

Key words: next generation sequencing; NGS; clinical samples; diagnostics



# SEKVENCIJANJE CELOTNEGA GENOMA VIRUSA PRAŠIČJE EPIDEMIČNE DIAREJE S TEHNOLOGIJO ION TORRENT

Manica Ipavec<sup>1</sup>, Urška Kuhar<sup>1</sup>, Darja Kušar<sup>1</sup>, Bojan Papić<sup>1</sup>, Simon Koren<sup>2</sup>, Nataša Toplak<sup>2</sup>, Ivan Toplak<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta; <sup>2</sup>Omega d.o.o, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Klinični primeri prašičje epidemične diareje (PED) so se v Evropi prvič pojavili leta 2014, virus PED pa smo v Sloveniji prvič potrdili januarja 2015 z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Določanje celotnega genoma virusa PED smo izvedli iz vzorcev blata prašičev, ki smo jih v okuženi reji odvzeli septembra 2015. Za določitev zaporedja celotnega virusnega genoma smo uporabili visoko zmogljivo tehnologijo Ion Torrent. Analiza celotnega genoma virusa PED SLO/JH-11/2015 ter filogenetska primerjava z drugimi sevi PEDV sta potrdila, da je ugotovljeni sev virusa PED genetsko zelo podoben predhodno opisanim sevom SINDEL iz Nemčije, Francije in Belgije. Genom PEDV, ki smo ga določili v tej raziskavi, je po naših podatkih šele četrti objavljen celotni genom PEDV v Evropi in prvi objavljen genom PEDV v Sloveniji.

**Ključne besede:** Virus prašičje epidemične diareje; diagnostika; določitev celotnega genoma; prašič

## Uvod

Prašičja epidemična diareja (PED) je zelo kužna virusna bolezen, ki so prvič opisali leta 1971 v Angliji. Leta 1978 so odkrili, da je njen povzročitelj nov koronavirus (1). Virus prašičje epidemične driske (PEDV) uvrščamo med alfakoronaviruse. Po prvih opisanih primerih v Angliji so o virusu poročali tudi iz drugih evropskih držav, kot so Belgija, Nizozemska, Nemčija, Francija. PED so v nadaljevanju v Evropi ugotavljali le sporadično, leta 2005 pa so zabeležili obsežno epidemijo PED v severni Italiji. V Aziji so v številnih primerih poročali o driski pri prašičih, ki jo povzroča PEDV. O prvih pojavih PEDV v Združenih državah Amerike so poročali maja leta 2013, v naslednjih mesecih pa že v 25 zveznih državah. Virus se je razširil tudi v druge države Severne in Latinske Amerike, kot so Kanada, Mehika, Peru, Ekvador, Dominikanska Republika in Kolumbija (2). Leta 2014 je bila v ZDA so odkrili novo genetsko različico seva PEDV, sev OH851, ki ima insercije in delecije v proteinu S, v nadaljevanju so podobne seve poimenovali kot sevi SINDEL (3). Leta 2014 so prisotnost sevov SINDEL potrdili tudi v Nemčiji, Franciji, Belgiji in na Japonskem (2). V Sloveniji smo prvi klinični primer prašičje epidemične driske zaznali decembra 2014, PEDV pa smo v okuženi reji potrdili z metodo RT-PCR v realnem času januarja 2015 (4).

Virus PED prizadene prašiče vseh starosti, vendar le pri sesnih pujskih, do starosti enega tedna, prihaja do visoke mortalitete. Bolezen se primarno kaže kot obilna vodena driska, ki po nekaj dneh postopoma preneha. Poleg tega lahko pri prašičih opazimo še bruhanje, neješčnost in povišano telesno temperaturo. Oboleni sesni pujski navadno hitro poginejo zaradi dehidracije (5).

## Material in metode

Izolacijo virusne RNA iz vzorcev fecesa smo opravili s komercialnim kompletom »QIAamp viral RNA kit« (Qiagen, Hilden, Nemčija), pri čemer smo upoštevali navodila proizvajalca. V nadaljevanju smo vzorce dodatno obdelali še z reagentom TRIzol po standardnem protokolu. Pripravo knjižnice RNA za nadaljnje sekvenciranje smo izvedli s komercialnim kompletom »Ion total RNA sequencing kit v2« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent, Carlsband, CA, USA). Za namnožitev tarčnih fragmentov DNA z emulzijskim PCR smo uporabili komplet »Ion PGM template OT2 200 kit« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent). Določitev zaporedja virusne nukleinske kisline smo izvedli s platformo na »Ion PGM System«, uporabo kompleta »Ion PGM HiQ sequencing kit« in čipa »Ion 314 Chip v2« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent). Za analizo zaporedij in sestavitev celotnega virusnega genoma smo dobljene rezultate primerjali z nemškim referenčnim sevom L00721/2014 iz podatkovne zbirke NCBI GenBank (dostopna številka LM645057). Analizo zaporedij smo izvedli s programsko opremo DNASTar Lasergene v.10.1.1 (DNASTar, Inc., Madison, WI, USA).

## Rezultati

Sestavljen genom slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015 je bil dolg 28.028 nukleotidov (nt), brez poli-A repa. Po analizi sestave genoma smo ugotovili, da je osnovna organizacija genoma enaka kot pri predhodno opisanem belgijskem sevu 15V010 (KR003452). V pridobljenem zaporedju smo določili bralne okvirje: ORF1a, ORF1b, protein receptorja, membranski protein, nukleoprotein ter protein ovojnice.

Nadalje smo pridobljeno zaporedje celotnega genoma in zaporedje, ki kodira protein S (ang. *spike* - S) primerjali z 48 celotnimi genomi PEDV, ki so na voljo v podatkovni zbirki NCBI GenBank. Slovenski sev je bil filogenetsko najsorodnejši (*i*) francoskemu sevu FR/001/2014 z 99,8 % podobnostjo in s 44 nukleotidnimi razlikami, (*ii*) nemškemu sevu GER/L00719/2014 (LM645057) z 99,8 % podobnostjo in 49 nukleotidnimi razlikami, ter (*iii*) belgijskem sevu BEL/15V010/2015 z 99,7 % podobnostjo in 93 nukleotidnimi razlikami. V primerjavi s prvim SINDEL sevom OH851 (KJ399978) se genom našega seva razlikuje v 185 nukleotidih, kar je 99,3 % podobnost obeh genomov. Omenjenim sevom so filogenetsko blizu tudi drugi severnoameriški sevi, kot na primer USA/Indiana12.83/2013 (KJ645635) z 99,6 % podobnostjo, USA/Minnesota52/2013 (KJ645704) z 99,4 % podobnostjo, USA/Iowa106/3013 (KJ645695) z 99,4 % podobnostjo in USA/Ohio126/2014 (KJ645702) z 99,1 % podobnostjo. Poleg ameriških sevov smo odkrili visoko, 99,3 % podobnost tudi z južnokorejskim sevom iz leta 2014 KNU-1406-1 (KM403155). V primerjavo smo vključili tudi prvi znan sev PEDV iz Anglije, CV777 (AF353511). Podobnost s slovenskim sevom je bila v tem primeru manjša, in sicer 97,0 %. Filogenetsko najbolj oddaljeni so bili nekateri azijski sevi, kot na primer južnokorejski sev SM98 (GU937797) iz leta 2011 s 96,7 % podobnostjo, kitajski sev LZC (EF185992) iz leta 2007 s 96,7 % podobnostjo in tajski sev EAS1 (KR610991) iz leta 2014 s 96,6 % podobnostjo nukleotidnega zaporedja.

Podobne rezultate smo dobili tudi pri filogenetski analizi zaporedij proteina S, pri kateri smo ugotovili veliko podobnost s prej omenjenim francoskim sevom FR001/2014 (99,8 %), nemškim sevom L00791/2014 (99,7 %), belgijskim sevom 15V010 (99,5 %), južnokorejskim sevom KNU-1406 (99,4 %) ter ameriški sevi USA/Minnesota35/2013 (99,5 %), USA/Indiana12.83/2013 (99,5 %), USA/Ohio126/2014 (99,4 %) in OH815 (99,4 %).

Podobnost z angleškim sevom CV777 v proteinu S je bila 95,7 %. Predhodne rezultati potrjuje tudi primerjava aminokislinskega zaporedja proteina S, pri čemer so podobnosti

s sevi, ki so filogenetsko najbližje slovenskemu sevu, presežale 99 %, medtem ko je bila podobnost z angleškim sevom CV777 96,1 %. Največje razlike v aminokislinskem zaporedju proteina S smo odkrili v primerjavi s tajskima sevoma CBR1 (KJ610993) ter EAS1 iz leta 2014, katerih podobnost s slovenskim sevom je znašala le 93,8 %.

## Razprava

Genom virusa PED SLO/JH-11/2015 je prvi celotni virusni genom, ki je bil sekvenciran na področju veterinarske medicine v Sloveniji. Z izvedeno raziskavo nam je uspelo prikazati, da lahko s tehnologijo Ion Torrent določimo celoten genom PEDV po izolaciji virusne nukleinske kisline neposredno iz vzorcev blata. Pri tem ugotavljamo, da uporaba specifičnih začetnih oligonukleotidov ni nujno potrebna, kar daje posebno vrednost temu pristopu, saj omogoča identifikacijo katerega koli patogena v vzorcu.

Analiza zgradbe genoma PEDV in njegova primerjava z drugimi sevi, ki so na voljo v genski bazi podatkov, kaže na to, da je ugotovitev PED SLO/JH-11/2015 v Sloveniji posledica vnosa SINDEL seva, ki je bil pred tem že ugotovljen v Evropi. To potrjujejo tudi filogenetske primerjave, kjer največjo podobnost ugotavljamo s tremi predhodno ugotovljenimi sevi iz Nemčije, Francije in Belgije.

Določitev in poznavanje celotnega zaporedja slovenskega seva PEDV prispeva k boljšemu razumevanju epizootiološke situacije tako v Sloveniji kot tudi v Evropi. Prav tako je to tudi korak naprej v poznavanju in razumevanju samega virusa PED in uvajanje nove tehnologije v področje raziskav.

Uporabljena tehnologija nove generacije sekvenciranja Ion Torrent je novost na področju slovenske veterinarske virologije. Izkušnje in znanja, ki smo jih pridobili tekom določanja prvega genoma PEDV, bodo olajšala nadaljnja raziskovanja, nova tehnologija pa ima potencial, da korenito izboljša naše razumevanje epidemiologije, genetike in genomike PEDV kot tudi številnih drugih povzročiteljev bolezni v veterinarski medicini.

Celotno nukleotidno zaporedje PEDV seva SLO/JH-11/2015 je v podatkovni zbirki NCBI GenBank objavljeno pod dostopno številko KU297956.

## Reference

1. Pensaert MB, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 1978; 58: 243-247.
2. Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo FJ, et al. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 2015; 1: 12
3. Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 917-919.
4. Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, et al. Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016; 4(2): e01725-15.
5. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal* 2015; 204: 134-143.

## **Whole genome sequencing of the porcine epidemic diarrhoea virus by Ion Torrent sequencing technology**

In 2014, the first clinical case of porcine epidemic diarrhoea (PED) in Europe was described. In January 2015, the first PED virus-infected herd in Slovenia was confirmed by polymerase chain reaction. The determination of the whole viral genome has been conducted from stool samples, collected from infected herd in September 2015. Ion Torrent next-generation sequencing technology has been used for the first time. Whole genome analysis of PEDV strain SLO/JH-11/2015 and the phylogenetic comparison with the other PEDV strains have confirmed the emergence of previously confirmed SINDEL strain identified in Germany, France and Belgium. The PEDV genome obtained in this research is, according to our knowledge, the fourth published whole genome of PEDV in Europe and the first in Slovenia.

Key words: Porcine epidemic diarrhoea virus; diagnostics; whole genome sequencing; pig

# PRIMERJAVA METOD ZA OPREDELITEV KAKOVOSTI IN KONCENTRACIJE KNJIŽNIC NGS

Bojan Papić\*, Urška Kuhar, Darja Kušar

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Slovenija

bojan.papic@vf.uni-lj.si

Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) postaja sestavni del raziskav na praktično vseh področjih bioloških in biomedicinskih ved. Nadzor kakovosti knjižnic med pripravo knjižnic je ključen za pridobitev visoko kakovostnih in nepristranskih rezultatov (zaporedij). V raziskavi smo želeli dobiti vpogled v primerljivost različnih metod za fragmentacijo genomske DNA (gDNA) ter opredelitev koncentracije in kakovosti knjižnic NGS. S tem namenom smo gDNA fragmentirali encimsko (Ion Xpress Plus Fragment Library Kit) in mehansko (M220 Focused-ultrasonicator). Iz encimsko fragmentirane gDNA, ki smo jo izolirali iz 12 izolatov *Listeria monocytogenes*, smo izdelali knjižnice NGS. Koncentracijo knjižnic smo opredelili s tremi pogosto uporabljenimi metodami za določanje koncentracije DNA: (i) kapilarno elektroforezo (QIAxcel in LabChip GX; tudi za opredelitev kakovosti knjižnic), (ii) kvantitativnim PCR (GeneRead Library Quant Kit) in (iii) fluorimetrično (Qubit 3.0). Preverili smo tudi uspešnost izbora ~480 bp velikih fragmentov DNA s kroglicami Agencourt AMPure XP. Obe metodi fragmentacije DNA sta bili uspešni. Izmerjene koncentracije knjižnic so se med seboj razlikovale do 4,6-krat, kar kaže na znatne razlike med različnimi kvantitativnimi metodami. Izbor fragmentov DNA želene velikosti s kroglicami je bil uspešen. Za uspešno sekvenciranje je potrebna kombinacija kapilarne elektroforeze za nadzor kakovosti knjižnic in ene od ostalih kvantitativnih metod za opredelitev njihove koncentracije.

Ključne besede: sekvenciranje naslednje generacije (NGS); nadzor kakovosti; kvantifikacija DNA

## Uvod

Sekvenatorji naslednje generacije (NGS) omogočajo hkratno določanje nukleotidnega zaporedja več sto tisoč kratkih fragmentov DNA. Zaradi širokega nabora aplikacij na praktično vseh področjih bioloških in biomedicinskih ved postajajo sestavni del številnih laboratorijev za molekularno biologijo. Tehnologije NGS druge generacije, kot sta platformi Illumina in Ion Torrent, zahtevajo pripravo knjižnic NGS. Priprava knjižnic vključuje encimsko ali mehansko fragmentacijo DNA na fragmente želene velikosti ter vezavo adapterjev na oba konca fragmentov. Po potrebi lahko knjižnice NGS tudi označimo s črtnimi kodami DNA (ang. *barcoding*), kar omogoča hkratno sekvenciranje več knjižnic, in pomnožimo v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Tako pripravljene knjižnice NGS nato sekvenciramo. Za izdelavo nepristranskih in knjižnic NGS visoke kakovosti je ključnega pomena, da spremljamo njihovo kakovost že med posameznimi koraki priprave. Ključna koraka pri nadzoru kakovosti sta opredelitev kakovosti fragmentov DNA in natančno določanje koncentracije knjižnic NGS. Zaradi neprimerne nadzora kakovosti knjižnic so lahko rezultati sekvenciranja z NGS pristranski in neoptimalni. V primeru hkratnega sekvenciranja več knjižnic je še posebej problematična njihova neenakomerna zastopanost (1).

## Material in metode

Genomsko DNA (gDNA) dvanajstih izolatov *Listeria monocytogenes* smo izolirali s komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija). Koncentracijo gDNA smo določili fluorimetrično z aparaturo Qubit 3.0 (Qiagen). Za encimsko fragmentacijo gDNA smo uporabili komplet Ion Xpress Plus Fragment Library (Thermo Fisher Scientific, ZDA), s katerim smo 100 ng gDNA fragmentirali 7 minut v 40- $\mu$ l reakcijskih mešanicah. Mehansko fragmentacijo gDNA (100 ng gDNA v 50  $\mu$ l vzorca) smo izvedli s ultrasonikatorjem M220 Focused (Covaris, ZDA). Ciljna velikost fragmentov gDNA pri obeh metodah je bila ~480 bp, kar je optimalna dolžina fragmentov za sekvenciranje 400 bp velikih fragmentov DNA s kompletom Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (tehnologija Ion Torrent). Knjižnice NGS smo pripravili in označili s kompletom Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library (Thermo Fisher Scientific), pri čemer smo uporabili encimsko fragmentirano gDNA. Izbor fragmentov DNA velikosti ~480 bp smo izvedli s kroglicami Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, ZDA) po protokolu, opisanem v Bronner in sod. (2). Koncentracijo in kakovost DNA smo opredelili s kapilarnima elektroforezama QIAxcel (Qiagen) in LabChip GX (PerkinElmer, ZDA), fluorimetrom Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) in s kvantitativnim PCR –GeneRead Library Quant Kit (Qiagen).

## Rezultati

Fragmentacija DNA. Tako encimska kot mehanska metoda sta bili uspešni pri fragmentaciji gDNA na fragmente velikosti ~480 bp. Rezultati kapilarne elektroforeze so pokazali, da je bila večina fragmentov po encimski metodi dolga 300–700 bp, večina fragmentov po mehanski metodi pa 100–800 bp. V nobenem vzorcu nismo detektirali ostankov nezadostno fragmentirane gDNA.

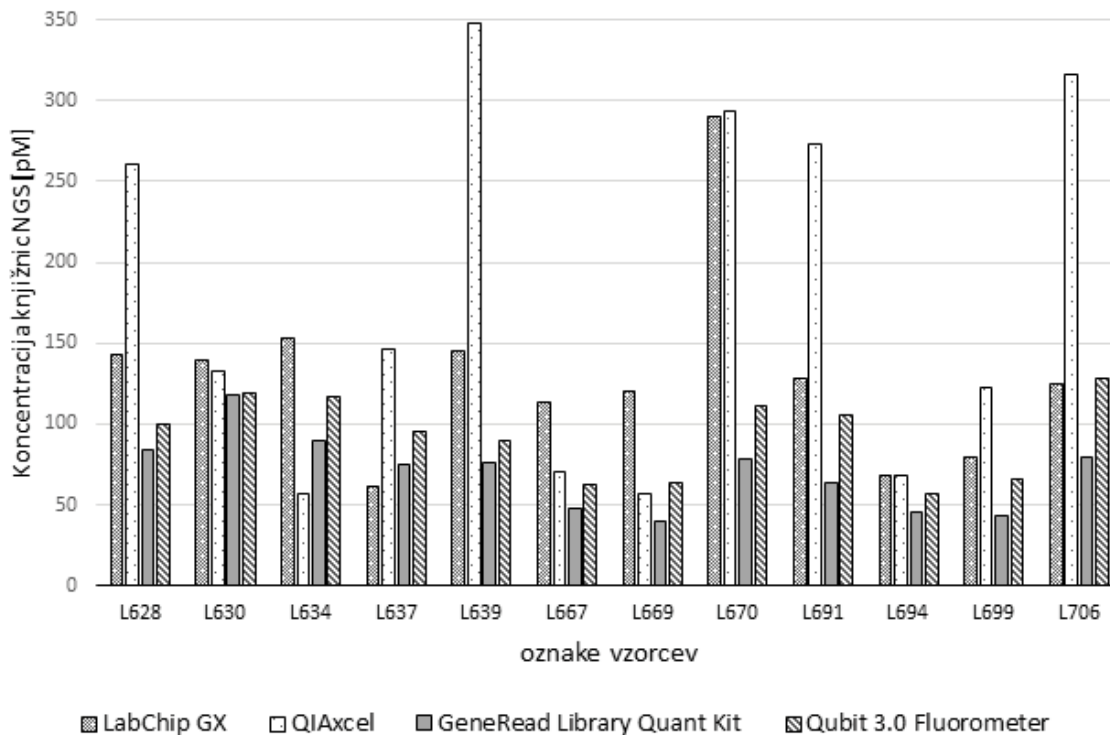
Opredelitev koncentracije knjižnic NGS. Rezultati kvantifikacije knjižnic NGS s štirimi različnimi metodami so prikazani na Sliki 1. Koncentracije so se med različnimi metodami razlikovale do 4,6-krat. Pri vseh 12 knjižnicah smo najvišjo koncentracijo DNA izmerili s kapilarno elektroforezo (LabChip GX in/ali QIAxcel). Rezultati kažejo, da kapilarna elektroforeza lahko preceni koncentracijo knjižnic. Pri 11 od 12 knjižnic smo najnižjo koncentracijo izmerili s kvantitativnim PCR (GeneRead Library Quant Kit). Rezultati meritev z aparaturo Qubit in kvantitativnim PCR so bili primerljivi (do 1,6-kratna razlika v koncentraciji).

Izbor ~480 bp velikih fragmentov DNA. Z magnetnimi kroglicami Agencourt AMPure XP smo uspešno ločili ~480 bp velike fragmente gDNA od preostalih (krajših) fragmentov DNA (Slika 2).

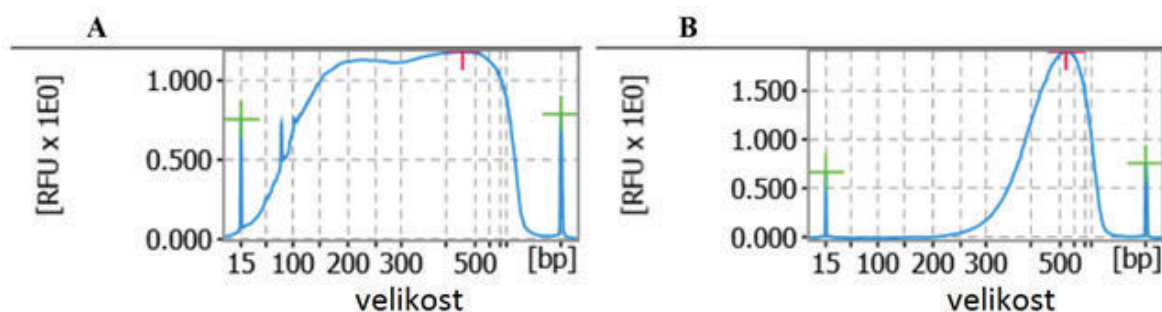
## Razprava

Obe metodi fragmentacije gDNA sta bili uspešni, zato sklepamo, da je bolj kot izbor metode fragmentacije pomembna kakovost vstopne gDNA (gDNA z visoko molekularno maso in brez ostankov RNA). Z mehansko fragmentacijo smo dobili fragmente gDNA z nekoliko večjim naborom velikosti, kar pa zaradi kasnejšega izbora fragmentov zelene velikosti ni omejujoč dejavnik. Pokazali smo, da s kroglicami Agencourt AMPure XP uspešno ločimo fragmente DNA velikosti ~480 bp od preostalih fragmentov gDNA. Postopek lahko torej predstavlja cenejšo alternativo drugim metodam, ki jih proizvajalci sicer običajno priporočajo za izbor fragmentov DNA zelene velikosti (npr. E-Gel SizeSelect, Pippin Prep).

Koncentracije knjižnic, izmerjene z različnimi metodami, so se medsebojno razlikovale do 4,6-krat. Znatna odstopanja med različnimi metodami najdemo tudi v literaturi, in sicer so Hussing in sod. (3) ob primerjavi sedmih različnih metod za določanje koncentracije knjižnic ugotovili do 100-kratno razliko v koncentraciji, razlike pa so bile odvisne tudi od koncentracijskega območja DNA. Najvišjo koncentracijo DNA vseh dvanajstih knjižnic smo izmerili s kapilarno elektroforezo, medtem ko smo pri 11 od 12 knjižnic najnižjo koncentracijo izmerili s kvantitativnim PCR. Iz tega sklepamo, da lahko kvantitativni PCR podceni koncentracijo knjižnic NGS, na kar kažejo tudi izsledki drugih raziskovalcev (4). Druga možna razlaga je, da kapilarna elektroforeza pogosto preceni koncentracijo



Slika 2: Mehansko fragmentirana gDNA, izolirana iz vzorca z oznako L630, ločena s kapilarno elektroforezo QIAxcel. A) Fragmentirana gDNA pred izborom ~480 bp dolgih fragmentov. B) Fragmentirana gDNA po izboru fragmentov velikosti ~480 bp s kroglicami Agencourt AMPure XP



Slika 1: Koncentracija knjižnic NGS, ki smo jo opredelili s štirimi različnimi metodami

DNA. Sklepamo lahko, da je za uspešno sekvenciranje potrebna kombinacija kapilarne elektroforeze za nadzor kakovosti knjižnic in ene od kvantitativnih metod za določanje njihove koncentracije. Natančna opredelitev koncentracije knjižnic pred nanosom na platformo (čip oz. pretočno celico) za sekvenciranje je ključna za uspešno sekvenciranje. Izpostaviti velja tudi pomanjkljivost kvantitativnega PCR in fluorimetra Qubit, ki za izračun molarne koncentracije DNA potrebujeta vnaprej določeno povprečno velikost fragmentov v knjižnici in sta od nje močno odvisna. Glede na veliko odstopanje med meritvami, ki so predstavljene v tej raziskavi, se kaže potreba po (i) optimiziranih in enotnih protokolih za kontrolo kakovosti, (ii) identifikaciji vzrokov za podcenjevanje oz. precenjevanje koncentracije DNA pri določenih kvantitativnih metodah in (iii) razvoju novih, visoko občutljivih metod za opredelitev koncentracije in kakovosti DNA. Z visoko občutljivimi in natančnimi metodami za opredelitev koncentracije knjižnic bi lahko izboljšali potek sekvenciranja in dobljene rezultate. Poleg tega bi boljša kvantifikacija lahko omogočala, da v postopek NGS ne bi bilo potrebno vključevati koraka pomnoževanja knjižnic s PCR, ki je sicer v določenih primerih potreben, a vnaša pristranskost. Primer novejših in visoko občutljivih metod za kvantifikacijo knjižnic, ki hkrati omogoča tudi oceno njihove kakovosti, je kapljični digitalni PCR (ddPCR) (1).

## Reference

1. Robin JD, Ludlow AT, LaRanger R, Wright WE, Shay JW. Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. *Sci Rep* 2016; 6: 24067, 10 str. (doi:10.1038/srep24067)
2. Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved protocols for Illumina sequencing. *Curr Protoc Hum Genet* 2009; July: 0 18, 46 str. (doi:10.1002/0471142905.hg1802s62)
3. Hussing C, Kampmann ML, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries. *Forensic Sci Int* 2015: Genetics Supplement Series 5: e276–e278.
4. Heydt C, Fassunke J, Künstlinger H, Ihle MA, König K, Heukamp LC, Schildhaus HU, Odenthal M, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLOS One* 2014; 9(8): e104566.

## Comparison of methods for NGS library quality control and quantification

Next-generation sequencing (NGS) is rapidly becoming an integral part of biological and biomedical sciences. Quality control during NGS library preparation is essential for obtaining high quality and unbiased sequencing results. In this study, different methods for genomic DNA (gDNA) shearing as well as NGS library concentration and quality assessment were compared. From 12 *Listeria monocytogenes* isolates, gDNA was extracted and enzymatically (Ion Xpress Plus Fragment Library Kit) or mechanically (M220 Focused-ultrasonicator) fragmented. Enzymatically sheared gDNA was used to construct NGS libraries. Three commonly used methods for library quantification were used: (i) capillary electrophoresis (QIAxcel and LabChip GX; also for library quality assessment), (ii) quantitative PCR (GeneRead Library Quant Kit) and (iii) fluorimetry (Qubit 3.0). Also, the performance of



DNA fragment size selection using Agencourt AMPure XP beads was assessed. Both DNA fragmentation methods proved successful. NGS library concentrations varied up to 4.6-fold, indicating marked variability of quantitative methods. Size selection of ~480 bp DNA fragments using Agencourt AMPure XP beads proved successful. In conclusion, a successful sequencing reaction requires a combination of capillary electrophoresis for library quality assessment and one of the remaining quantification methods for library concentration assessment.

Key words: next generation sequencing (NGS); quality control; DNA quantification

# DETEKCIJA DNA PREDVIDENEGA NAPADALCA NA KADAVRU OVCE

Jelka Zabavnik Piano\*, Marko Cotman

<sup>1</sup>Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jelka.zabavnik@vf.uni-lj.si

V dveh zaporednih nočeh je neidentificirani napadalec (ali več napadalcev) poklal ali hudo ranil 35 ovac, ki so živele na pašniku v zaprti ogradi. Zaradi močnega zaščitnega volnenega kožuha na telesih ovac so bile smrtne rane prisotne predvsem na glavah živali. Štiri glave zaklanih živali so bile pet dni po napadu dostavljene v laboratorij, da bi na njih poiskali sledi možnega napadalca. Sledi slin smo iskali predvsem ob robovih ran. Iz vzorcev zlepljenih dlak ob robovih ran na glavah živali smo z reagenti QIAamp DNA Investigator kit proizvajalca Qiagen izolirali DNA. Na izolirani DNA smo z verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR) pomnoževali kratke tandemske ponovitve (short tandem repeat – STR), značilne za pse. Za pomnoževanje lokusov STR smo uporabili reagent Canine Genotypes Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics), ki je namenjen za genotipizacijo, identifikacijo in preverjanje starševstva ter pasem pri psih. Ločevanje in opazovanje dobljenih fluorescentno označenih produktov PCR smo izvedli s kapilarno elektroforezo na ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Pri enem vzorcu smo uspešno določili DNA profil 11 lokusov STR. Ta profil bi lahko pripadal predvidenemu napadalcu tropa ovac, ki pripada družini psov.

Ključne besede: živalska forenzika; napad; profil DNA; kratke tandemske ponovitve

## Uvod

Na ograjenem pašniku je meseca marca neidentificirani napadalec ali skupina napadalcev ponoči napadla trop ovac. Lastnik je zjutraj na pašniku našel zaklane ali hudo ranjene živali. V naslednji noči se je napad ponovil in v dveh zaporednih nočeh je bilo vseh 35 ovac zaklanih ali tako hudo ranjenih, da so bile kasneje humano usmrčene. Ovce so imele kožuh z dolgo volno, ki je ščitila trup pred ugrizi, zato je bila večina smrtnih ran na glavah živali. Po dogovoru z lastnikom ovac so bile pet dni po napadu štiri glave ubitih ovac dostavljene v laboratorij, da bi na glavah poiskali možne sledi, ki bi omogočile identifikacijo profila DNA napadalca.

Biološki vzorci psov, iz katerih je možno ugotovili profil lokusov kratkih tandemskih ponovitev (short tandem repeat – STR), ki omogočajo identifikacijo, so pogosto prisotni na prizoriščih, obravnavanih v različnih sodnih procesih. Lahko gre za povzročitelje nesreč, udeležence v nesrečah, za primere mučenja živali ali pa ugotavljanje sledi psa ljubljenca na oblačilih povzročitelja kriminalnega dejanja. Za razliko od uporabnosti podatkov o humanih profilih STR, ki omogočajo statistično vrednotenje pri proučevanju humanih sledi (1), pa je le malo uporabnih validiranih postopkov določanja profila STR in malo podatkov o profilih STR v različnih populacijah psov (2, 3).

Želeli smo ugotoviti, ali je pet dni po napadu možno dobiti uporabne sledi iz kadavrov ovac in ali z reagenti Canine Genotypes, Panel 1.1 lahko pridobimo podatke za identifikacijo napadalca.

## Material in metode

Vsaki živali smo odstrigli vzorec zlepljenih dlak ob ranah na glavi. Iz teh vzorcev smo z reagenti QIAamp DNA Investigator kit (Qiagen), ki deluje na osnovi vezave DNA na silikonske delce, izolirali DNA. Uporabili smo protokol proizvajalca za izolacijo DNA iz sledov telesnih tekočin. Za psa specifične STR smo pomnožili v reakciji PCR z uporabo reagentov Canine Genotypes, Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics). Reakcijo PCR smo izvedli po navodilih proizvajalca, v vsaki reakciji smo uporabili po 1 ml DNA vzorca. Za preverjanje občutljivosti postopka smo uporabili znano koncentracijo DNA (od 2,0 ng do 7,5 pg), izolirano iz psa. Velikost fluorescentno označenih produktov PCR smo ocenjevali s kapilarno elektroforezo na ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

## Rezultati

S preverjanjem značilnosti postopka določanja profila STR na znani koncentraciji DNA z reagentom Canine Genotypes, Panel 1.1 (4) smo v laboratoriju dobili vseh 18 lokusov STR s koncentracijo DNA od 2 ng do 250 pg. Pri uporabi 125 pg znane DNA psa se je nekaj vrhov STR izgubilo.

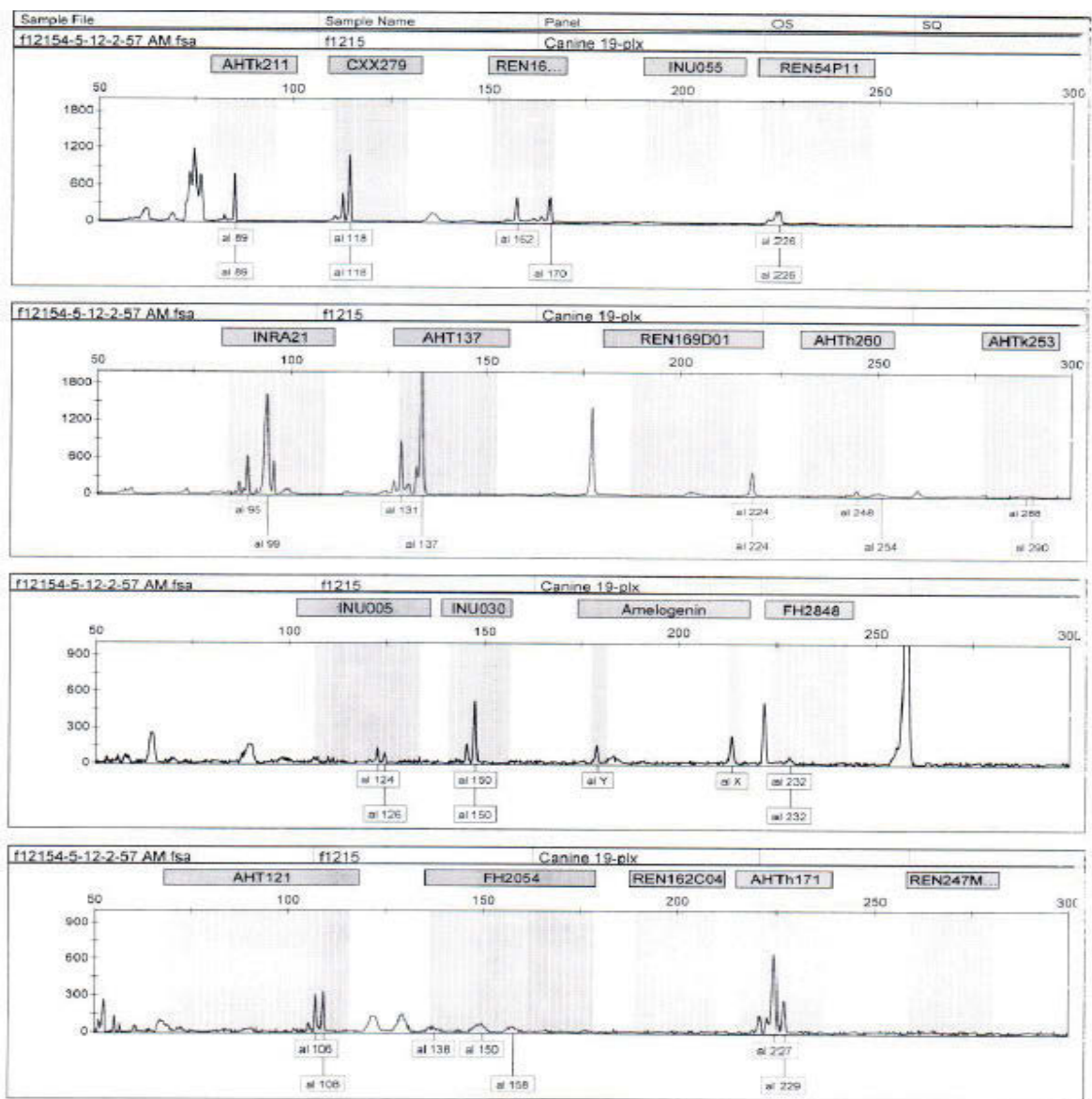
Pri določitvi profila STR na vzorcih iz štirih kadavrov smo na enem vzorcu izolirali DNA psa, kateremu smo določili profil 11 lokusov STR. Gen za amelogenin v tem vzorcu je imel profil, značilen za kromosom X in kromosom Y.

## Razprava

Za preverjanje starševstva psov uporabljamo v našem laboratoriju reagent Canine Genotypes Panel 1.1 proizvajalca Finnzymes Diagnostics, ki omogoča določitev 18 lokusov STR in gena za amelogenin za določitev spola (5). Ker imamo že nekaj podatkov o profilih STR pri psih, smo želeli ugotoviti ali je metoda uporabna tudi za določanje profila STR v sledih. Za proučevanje DNA sledi psov v forenziki se pogosto uporabljajo reagenti StockMarks Dog Genotyping Kit (Applied Biosystems) (2) in reagenti Canine Genotypes, Panel 2.1 (Finnzymes Diagnostics) (3).

V našem primeru smo dobili vzorce v laboratorij pet dni po napadu. Predvidevali smo, da zlepljena dlaka okoli rane vsebuje biološki material ovce in sledi sline napadalca, zato smo iz teh zlepljenih dlak izolirali DNA. V enem primeru od štirih nam je uspelo določiti profil STR, značilen za osebek iz družine psov, ki bi lahko pripadal napadalcu. Profil gena za amelogenin, s katerim določamo spol osebka, je bil značilen za moški spol, vendar zaradi visoke ohranjenosti nekaterih odsekov tega gena pri različnih živalskih vrstah, ne moremo izključiti pomnoževanja gena za amelogenin katerega drugega osebka, ki je lahko kontaminiral dlako ovce.

Ovce na pašniku pred napadom niso bile v stiku s psi, vendar so kadavri več dni potovali do laboratorija, zato kontaminacije z biološkim materialom na poti do laboratorija ne moremo izključiti. Potrditev ujemanja dobljenega profila bi bila mogoča ob izolaciji DNA dejanskega osumljenca in primerjavi profilov STR s profili STR na kadavru ovce.



AHTk211	CXX279	REN169O18	INU055	REN54P11	INRA21	AHT137	REN169D01	AHTk260	AHTk253
89/89	118/118	162/170	NP	226/226	95/99	131/137	224/224	NP	NP
INU005	INU030	FH2848	AHT121	FH2054	REN162C04	AHTk171	REN247M23	Amelogenin	
124/126	150/150	NP	106/108	NP	NP	227/229	NP	X/Y	

Slika 1: Profili lokusov STR, značilnih za psa, ugotovljeni na DNA, izolirani iz zlepljene dlake na robu rane na glavi ovce

## Reference

1. Servick K. Sizing up the evidence. *Science* 2016; 351:1130-2.
2. Kanthaswamy S, Tom BK, Mattila AM, Johnston E, Dayton M, Kinaga J, Erickson BJ, Halverson J, Fantin D, DeNise S, Kou A, Malladi V, Satkoski J, Budowle B, Smith DG, Koskinen MT. Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 2009; 54: 829-40.
3. Ogden R, Mellanby RJ, Clements D, Gow AG, Powell R, McEwing R. Genetic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6: 63-5.
4. Cotman M, Zabavnik Piano J. Assessment of slovenian dog population by the micro-satellite marker panel consisting from 18 STR loci. In: 9<sup>th</sup> ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine. Bol, Island of Brač: International Society for Applied Biological Sciences 2015, 134.
5. Cotman M, Zupanič-Pajnič I, Zabavnik Piano J. Identification of canine DNA from mixed DNA sample in traces. In: 32<sup>nd</sup> Conference of the International Society for Animal Genetics. Edinburgh: International Society for Animal Genetics 2010, 57.

## Detection of suspect attacker DNA on the sheep cadaver

On two successive nights a flock of sheep living in the fenced meadow was attacked by an unidentified attacker(s) and all of thirty-five sheep were killed or badly injured. Deadly injuries were mainly located on the heads of the sheep because of the long protective woollen fleece on the sheep bodies. Four heads of the killed animals were delivered to the laboratory five days after the attack to look for traces of the suspect attacker. Traces of saliva were looked for specially at the edges of the lacerations. From the samples of the glued hair near the lacerations on sheep heads DNA was isolated using QIAamp DNA Investigator kit from Qiagen. Canine specific short tandem repeats (STRs) were amplified in the PCR reaction using the kit Canine Genotypes, Panel 1.1 (Finnzymes Diagnostics) that is designed for canine genotyping, identification, parentage testing and breed testing. Separation and visualisation of the obtained fluorescently labelled PCR products was performed by capillary electrophoresis on the ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). In one sample the DNA profile on 11 STR loci was determined. The obtained STR profile could belong to the suspect attacker on the flock from the canidae family.

Key words: animal forensics; attack; DNA profiling; short tandem repeats

**Varna hrana**

Food safety

---

# VPLIV KULTURE ZAGOTAVLJANJA VARNIH ŽIVIL NA ŽIVILSKO-PREHRANSKO-OSKRBOVALNO VERIGO

Mojca Jevšnik

Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

mojca.jevsnik@zf.uni-lj.si

Prispevek obravnava vpliv kulture zagotavljanja varnih živil na živilsko-prehransko-oskrbovalno verigo. Izpostavi inovativne pristope, ki naj bi v verigi zagotavljanja varnih živil pripomogli k dvigu kulture zagotavljanja varnosti živil pri vseh zaposlenih. Predstavljena so orodja in tehnike spodbujanja zaposlenih, ki bi naj pozitivno vplivala na dvig stopnje usposobljenosti in motivacije zaposlenih za delo po načelih varnosti živil. Nosilec živilske dejavnosti oziroma odgovorna oseba na obravnavanem področju je ključni dejavnik pri prepoznavanju šibkosti v sistemu zagotavljanja varnih živil, spreminjanju ustaljenih navad zaposlenih in vpeljevanju inovativnega pristopa, ki se učinkovito in hitro odziva na spremembe v notranjem in zunanjem okolju. Slednje lahko gradi novo dimenzijo varnosti, t.i. kulturo zagotavljanja varnosti živil, ki ima temelje v etiki na področju varnosti živil.

Ključne besede: kultura zagotavljanja varnosti živil; nosilec živilske dejavnosti; zaposleni; usposabljanje; vedenje

Sodobni pristopi živilske industrije ter njena visoko razvita procesna in distribucijska tehnologija proizvajata raznovrstna živila, ki so potrošniku dostopna v obliki različnih izdelkov in cen na policah hitro rastočih trgovskih središč. Z razvojem znanosti in tehnologije je tudi znanje o tveganjih popolnejše, vendar pa novi posegi v tehnologijo in distribucijo povzročajo vedno nova tveganja (Raspor, 2007). Spremembe in dopolnitve zakonodaje na področju živilstva, vedno nove tehnologije in znanstvena spoznanja, ki vodijo v inovacije, pomembne za potrošnika, zahtevajo razumevanje in poznavanje novosti pri vseh členih živilsko-prehransko-oskrbovalne (ŽPO) verige. Še posebej pa je izpostavljena odgovornost in s tem pomembnost nosilca živilske dejavnosti oziroma njegove odgovorne osebe in vseh zaposlenih, da zagotovijo varnost živil na osnovah sistema HACCP. Če so vodstvo, odgovorne osebe in zaposleni seznanjeni s pomenom zagotavljanja varnosti živil v svojem procesu in vzdolž verige, bo le-to nedvomno vplivalo na rast kulture zagotavljanja varnosti živil. Slednje ima vpliv na dojemanje in odnos vseh zaposlenih do zagotavljanja higiene in varnih živil, prehrane nasploh ter zdravja. Ugotovljeno je, da je žarišče problema zagotavljanja varnosti živil premalo izobražen, usposobljen, motiviran in/ali zadovoljen človek. Tudi vsebinska analiza znanstvenih del o vrstah in vzrokih ovir pri implementaciji in delovanju sistema HACCP kaže, da je skoraj polovica ovir za neučinkovitost sistema HACCP, vezanih na človeški faktor (Jevšnik in sod., 2006; Jevšnik, 2008; Jevšnik in sod., 2008). Upoštevajoč človeka kot dejavnik tveganja Gilling in sodelavci (2001) izpostavljajo tri ključne elemente, ki vplivajo na učinkovitost sistema HACCP, in sicer znanje, odnos do sistema in vedenje. Pri tem znanje predstavlja osnovo oz. steber pridobljenih ugotovitev, odnos do sistema HACCP se razvije kot mentalna reakcija na znanje, vedenje pa je posledica pridobljenega znanja in razvitega odnosa do sistema HACCP.

Boljše razumevanje vedenja zaposlenih na področju varnosti živil bo omogočilo razvoj boljših metod in komunikacijskih strategij, s katerimi se bosta varnost in kakovost živil v (ŽPO)

verigi izboljšali. To je vodilo za oblikovanje inovativnega pristopa, ki bo imel v omenjeni verigi sposobnost učinkovitega in hitrega odzivanja na ugotovljene pomanjkljivosti in nepravilnosti pri delu ter spremembe na sistemskem področju. Inovativnost sistema je v tem, da vključi in poudari pomembnost vsakega posameznika v verigi ter poudari pomen izobrazbe živilskih smeri in usposobljenost za specifična dela z živili kot najpomembnejšo točko učinkovitega delovanja sistema za zagotavljanje varnosti živil. Omenjeni pristop se povezuje s poslanstvom in cilji »Kulture zagotavljanja varnih živil«. Le-ta izpostavi in poudari vidike subjektivnega načina dojemanja koncepta varnosti živil. Inovativnost pristopa je v kompleksni obravnavi vseh zaposlenih, ki so postavljeni za obvladovanje varnosti in kakovosti živil, ter v njihovi skrbi za doseg končnega cilja – varno živilo za potrošnika in s tem zdravje ljudi. S kulturo zagotavljanja varnosti živil vstopamo na raven integralnega obvladovanja varnosti živil, ki temelji na človeku. Razumevanje vseh niti in vrzeli, ki so na poti do vzpostavitve kulture zagotavljanja varnih živil, zahteva sistematični pristop in čas, ki ga vodstvo nameni novi obliki strukture obvladovanja varnih živil. Kultura je med drugim tudi odnos do nečesa, kar pomeni, da se morajo nekatere prej tradicionalne oblike dojemanja in zagotavljanja varnih živil vzpostaviti na novo; kot take dobijo trdnejšo vrednost in trajnejši način obvladovanja varnosti živil skozi celotno verigo ŽPO. Hitrost sprememb, ki potekajo na ravni vedenja človeka, je vsekakor odvisna od posameznika in njegove neposredne okolice. Zato ima pri tem odgovorna oseba veliko in neprecenljivo vlogo, ki brez podpore vodstva ne more obveljati. Nov pristop obvladovanja varnosti živil bi moral nujno temeljiti na elementih etike (kot osnove za dvig kulture varnih živil), informiranosti (kot pogoja za obstoj v svetu nenehnih sprememb in inovacij), motivacije in zadovoljstva zaposlenih pri delu (kot temelj dobrega počutja zaposlenih) in nove filozofije posameznega člana verige ŽPO (kot pogoj za spremembe v načinu mišljenja in dela posameznika).

## Reference

- Gilling SJ, Taylor EA, Kane K, et al. Successful hazard analysis critical control point implementation in the United Kingdom: understanding the barriers through the use of a behavioral adherence model. *Journal of Food Protection* 2001; 64, 5: 710-715.
- Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Meta-analysis as a tool for barriers identification during HACCP implementation to improve food safety. *Acta aliment* 2006; 35(3): 319-353.
- Jevšnik M. Integralno vrednotenje vključitve sistema HACCP pri zagotavljanju varnih živil: doktorska disertacija = Integral evaluation of HACCP system for food safety management: doctoral dissertation. Ljubljana, 2008: 176.
- Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food control* 2008; 19(12): 1107-1118.
- Raspor P. Izzivi sedanjosti v živilsko-prehrabeni verigi. V: Rugej D (ur.). Zbornik predavanj, Posvetovanje Varna in zdrava hrana na mizi potrošnika, v Ljubljani, 7. december 2007. Ljubljana: Visoka šola za zdravstvo, 1-6.

## The impact of creating a food safety culture on food supply chain

The impact of food safety culture on food supply chain is discussed. The innovative approaches, which should be in the food supply chain contributed to raising food safety cultu-



re among employees, are highlighted. It presents the tools and techniques of encouraging employees to make a positive impact on raising the level of employee qualifications and motivation to work according to the principles of food safety. Food business operator or person which is responsible for food safety is a key factor in identifying weaknesses in the food safety, changing entrenched habits of employees and introducing an innovative approach to effectively and rapidly respond to changes in the internal and external environment. This can build a new dimension of food safety, the so-called food safety culture, which has the foundation of ethics in the field of food safety.

Key words: food safety culture; food bussines operator; food handler; training; behavior

# DOLOČANJE OSTANKOV POMIRJEVAL

Jožica Dolenc\*, Mitja Bukovec, Andrejka Močnik, Ksenija Šinigoj Gačnik, Zlatka Bajc

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

jozica.dolenc@vf.uni-lj.si

Pomirjevala se uporabljajo v veterinarski medicini. Pri rejnih živalih majhni odmerki zmanjšujejo agresivnost živali in ugodno vplivajo na težo. Posebno prašiči so občutljivi na stres, ki lahko vpliva tudi na kakovost njihovega mesa.

Razvoj analitske tehnike je prinesel velike spremembe v načinu določanja ostankov veterinarskih zdravil. Obstoječe metode nadomeščamo z novimi, ki omogočajo hitrejšo pripravo vzorcev ter hkratno določanje velikega števila substanc. Razvili smo presejalno metodo določanja ostankov karazolola, azaperona, azaperola, acepromazina, propionilpromazina in klorpromazina v različnih živilih živalskega izvora in urinu. Priprava vzorca pred kromatografsko določitvijo (HPLC) je bila enaka za vse matrice in vključuje uporabo ekstrakcijskih kolon Evolute CX. Za kromatografsko ločbo smo uporabljali monolitno analitsko kolono Chromolith®. Pri določitvi smo kombinirali dva tipa detektorjev, spektrofotometrični detektor z nizom diod (DAD) in fluorescentni detektor (FLD). Metodo je mogoče uporabiti tudi kot potrditveno za tiste od naštetih substanc, katerih uporaba ni prepovedana v veterinarski medicini.

Ključne besede: pomirjevala; živila; HPLC-DAD-FLD

## Uvod

Pri rejnih živalih majhni odmerki pomirjeval zmanjšujejo agresivnost živali in ugodno vplivajo na težo. Posebno prašiči so občutljivi na stres, ki lahko vpliva tudi na kakovost njihovega mesa ali celo povzroči smrt. Pred prevozom prašičev v klavnico se zato praviloma uporabi karazolol ali azaperon (Arneth W., 1990; Cerkvenik-Flajs V., 2007). Slednji metabolizira v azaperol, tako da je potrebno poznati vsebnosti obeh analitov. Promazini so, zaradi genotoksičnih lastnosti, v veterinarski medicini prepovedani.

Analitska metoda mora zajemati vse pomembne aktivne substance in metabolite. Njena občutljivost mora biti ustrezna za določanje prepovedanih promazinov, hkrati pa mora biti delovno območje dovolj široko, da je z njo mogoče nadzorovati koncentracije dovoljenih pomirjeval. Idealne so metode, pri katerih je priprava popolnoma neodvisna od matrice, tako da lahko različne matrice merimo hkrati. Ponovljivost oziroma raztros izmerjenih vrednosti in pa obnovljivost, to je ponovljivost postopka v daljšem časovnem obdobju in za različne vzorce, pa je eden od najpomembnejših kriterijev ustreznosti analiznega postopka.

## Materiali in metode

Poleg običajne laboratorijske opreme in topil smo uporabljali:

- ekstrakcijske kolone Biotage: Evolute CX-50, 6 ml, 200 mg,
- Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC,
- Agilent 1260 Infinity DAD detektor (s 4 µl celico in 60 mm optično potjo, ki je narejen posebej za določanje nizkih koncentracij),

- Agilent 1260 Infinity FLD detektor,
- analitska kolona Merck Chromolith® high resolution RP-18 endcapped (100 x 4.6 mm).

## Rezultati

Za analizo smo potrebovali 5 g vzorca. Po ekstrakciji pomirjeval z acetonitrilom smo ekstraktu uravnali pH in ga prečistili z ekstrakcijo tekoče-trdno na kondicioniranih ekstrakcijskih kolonicah. Nečistoče smo izprali z metanolom, pomirjevala pa eluirali z alkalnim metanolom. Sledilo je koncentriranje eluata pod dušikom do suhega in rekonstitucija vzorca v mobilni fazi. Pri analizi s tekočinsko kromatografijo smo uporabljali gradientno elucijo, mobilna faza je bila mešanica acetonitrila (MeCN) in 0,01 M natrijevega acetata s pH 4,5. Pretok mobilne faze je bil 0,7 ml/min, volumen injiciranega vzorca pa 0,1 ml. Promazine smo detektirali v UV območju, klorpromazin pri 256 nm, acepromazin in propionilpromazin pa pri 240 ali 280 nm. Za zaznavanje karazalola, azaperona in azaperola smo uporabili fluorescenčni detektor, molekule smo vzbujali s svetlobo 245 nm, merili pa izsevno svetlobo pri 345 nm.

## Razprava

Cilj razvoja je bil čim enostavnejša priprava vzorca pred merjenjem, pri kateri so ekstrakti dovolj čisti, da signale analitov pri izbranih koncentracijah ločimo od ozadja. Preskusili smo različne ekstrakcijske kolone tekoče-trdno: Agilentov Bond Elut EN QuEChERS, J.T. Baker Bakerbond NH<sub>2</sub>, Waters Oasis HLB in Oasis MCX, Phenomenex Strata-X-C, najboljše rezultate pa smo dobili z uporabo Biotage Evolute CX-50.

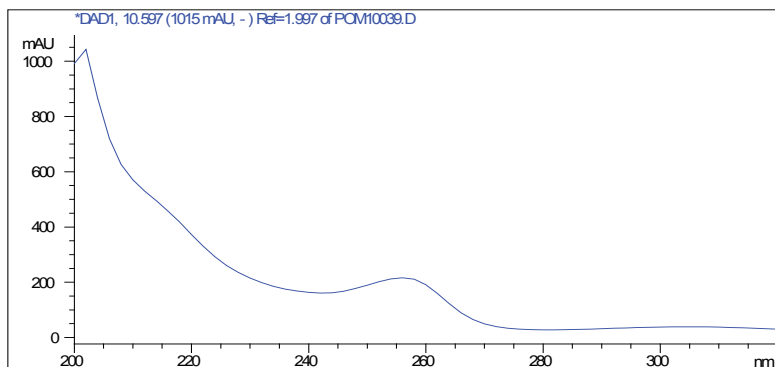
V procesu razvoja metode smo testirali celo vrsto analitskih kolon: Merck LiChrospher 60 RP-select B (250 x 4.0 mm; 5 µm), Phenomenex Synergi MAX-RP 80A (150 x 4.6 mm; 4 µm) ter monolitne Merck Chromolith® high resolution RP-18 endcapped (100 x 4.6 mm). Od kromatografske ločbe pričakujemo, da v čim krajšem času čim bolje loči prisotne analite med seboj – kromatografski vrhovi se ne smejo prekrivati. Zaradi najboljše ponovljivosti in najkrajših zadrževalnih časov in posledično najkrajšega časa analize, smo se odločili za slednjo.

Valovne dolže merjenja smo izbrali na osnovi absorpcijskih maksimumov analitov (Slika 1) in na osnovi čistosti ekstraktov posameznih matric.

Eden najpomembnejših elementov vsakega analiznega postopka je dokazovanje pravilnosti rezultatov. Skupaj s testiranimi vzorci smo vedno testirali slepi in obogateni vzorec. Količina dodanega analita k obogatenemu vzorcu je bila odvisna od tega, ali obstaja vrednost MRL ali ne. V prvem primeru smo dodali koncentracijo analita, ki je ustrezala 0,5-kratniku najmanjše vrednosti MRL, v drugem primeru pa je bil dodatek enak meji določljivosti naše metode (Tabela 1).

Kot je razvidno iz Tabele 1, je razvita metoda za večino matric bolj občutljiva, kot je nujno potrebno.

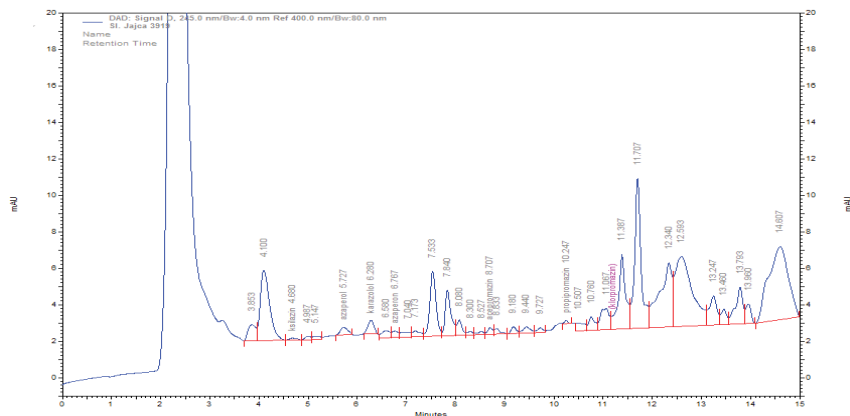
Kadar v vzorcih ni signalov na mestih, kjer so v obogatenem vzorcu signali dodanih analitov, je vzorec ocenjen kot negativen. V kolikor pa ima kateri od vzorcev večji signal na istem mestu, kot je signal katerega od dodanih analitov v obogatenem vzorcu, je tak vzorec

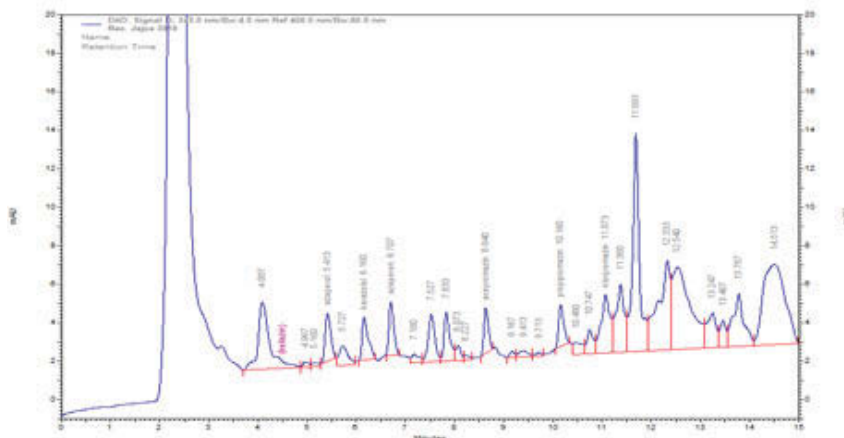


Slika 1: UV spekter klorpromazina

Tabela 1: Preglednica MRL in EURL priporočenih vrednosti za posamezne analite ter meja odločitve (CC $\beta$ ) razvitega analitskega postopka

analit	marker	vrsta živali	tkivo	MRL (37/2010) ali priporočene vrednosti* (CRL 2007) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	CC $\beta$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
azaperon	vsota azaperola in azaperona	prašič	ledvice	100	2,5
karazolol	karazolol	prašič	ledvice	25	0,5
		govedo	ledvice mleko	15 1	0,5 0,5
klorpromazin	klorpromazin	prašič	ledvice	10*	2,5
		govedo	ledvice mleko	10* 10*	2,5 2,5
		perutnina	jajca	10*	2,5
acepromazin	acepromazin	prašič	ledvice	50*	25
		govedo	ledvice	50*	25
propionilpromazin	propionilpromazin	prašič	ledvice	50*	25
		govedo	ledvice	50*	25





Slika 2: Kromatogram slepega (A) in obogatnega (B) vzorca jajc

sumljiv (Slika 2). V takih primerih je potrebna ponovna analiza s potrditveno metodo. V primeru klorpromazina je za potrditev obvezna uporaba LC-MS/MS, medtem ko ostala pomirjevala lahko kvantitativno ovrednotimo kar z opisano metodo.

## Reference

Arneth W. Multimethod for the residue-analysis of some tranquilizers and carazolol in animal tissue and urine. Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue conference, Noordwijkerhout: The Netherlands 1990: 101-104.

Cerkvenik-Flajs V. Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 2007; 586: 374-382. Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. Decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora (UL L 15, 20.1.2010, str. 1)

Community Reference Laboratories (CRLs) for residues according to Council Directive 96/23/EC. CRL's view on state-of-the-art analytical methods for national residue control plans. CRL Guidance Paper 2007

## Determination of sedative residue

Sedatives are used in veterinary medicine. In small doses sedatives at the farmed animals reduce the aggression and increase their weight. Pigs are especially sensitive to stress, which influences meat quality.

The technique development has brought changes in determination of veterinary medicine drugs residues. We replace the existing methods with new, which allows faster sample preparation and simultaneous determination of large number of analytes. We developed screening method for determination of carazolol, azaperone, azaperole, acepromazine, propionylpromazine and chlorpromazine in different food of animal origin and urine. We introduced a uniform clean-up procedure on solid phase extraction columns Evolute CX and used monolithic Chromolith® analytic column. The same chromatographic conditions for different matrixes are used and two detectors DAD and FLD connected in series were used.

Key words: sedative; food; HPLC-DAD-FLD

# UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJ *Salmonella* spp. – PRIMERJAVA POSTOPKOV

Majda Biasizzo\*, Urška Henigman, Urška Jamnikar Ciglencečki, Andrej Kirbiš, Stanka Vadnjal

Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

majda.biasizzo@vf.uni-lj.si

Bakterije vrste *Salmonella* spp. so lahko prisotne v živilih ter pri ljudeh predstavljajo vzrok obolenj, predvsem v obliki enterokolitisov. V živilih jih ugotavljamo z različnimi postopki in z uporabo različnih gojišč. Referenčna metoda za ugotavljanje salmonel je določena v Uredbi (ES) št. 2073/2005 ISO standard 6579. V naši raziskavi smo rezultate preiskav ob uporabi različnih postopkov in selektivnih gojišč, primerjali z rezultati pridobljenimi z referenčno metodo. Vzorce smo testirali z metodo PCR v realnem času, nasajanjem po obogatitvi na poltekoče gojišče Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar - MSRV kot je opisano v ISO 6579, Anex D, in po uporabi selektivnih plošč: IRIS *Salmonella*<sup>®</sup> Agar (Biokar), *Salmonella* Chromogenic Agar (Conda) in RAPID *Salmonella* Agar (BIO-RAD) nasajenih iz obogatitvenega bujona RVS - Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (Merk). Skupno smo testirali 58 vzorcev: 40 vzorcev mesa in 18 vzorcev jajc. Ugotovljena občutljivost plošč IRIS *Salmonella*<sup>®</sup> Agar pri testiranih vzorcih je bila 100% (25/25), molekularna metoda PCR v realnem času pa 98% (30/31).

Ključne besede: *Salmonella* spp.; primerjava postopkov; selektivna gojišča; PCR v realnem času; živila

## Uvod

Po podatkih epidemioloških služb so bakterije vrste *Salmonella* spp. za kampilobaktri najpogostejši povzročitelji bakterijskih enterokolitisov. Vzrok salmoneloznih obolenj najpogosteje predstavljajo kontaminirana živila in prav zato se tovrstne zoonoze nemalokrat izražajo v obliki večjih izbruhov obolenj. Okužbe s salmonelami še vedno predstavljajo zdravstveni in ekonomski problem po vsem svetu, ne glede na stopnjo razvitosti posameznih držav. V preprečevanje salmoneloznih okužb, povezanih s kontaminiranimi živali so vključeni vsi vpleteni v t.i. verigi od "od vil do vilic". Najpomembnejši delež v tej problematiki kljub temu nosijo nosilci živilskih dejavnosti. Osnovna skrb le-teh je, da proizvedena živila ne vsebujejo mikroorganizmov ali njihovih toksinov oz. metabolitov, ki predstavljajo nesprejemljivo tveganje za zdravje ljudi (Uredba (ES) št. 178/2002; Uredba (ES) št. 2073/2005). S tem namenom v okviru notranjega nadzora izvajajo vzorčenje surovin in končnih proizvodov, uradne službe pa vršijo vsakoletni Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev. Osnovni namen mikrobioloških preiskav, katerih cilj je ugotavljanje prisotnosti patogenih mikrobov v živilih je, da ugotovimo prisotnost mikroorganizmov tudi, ko se le-ti še v zelo nizki koncentraciji. Do konca roka trajanja nekega živila se namreč lahko razmnožijo do stopnje, ki predstavlja nevarnost za obolenje ljudi. Uredba (ES) št. 2073/2005 določa pri preiskavah na salmonele kot analitsko referenčno metodo ISO standard 6579. Ob uporabi Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) je izbira drugega selektivnega trdnega gojišča prepuščena izvajalcem preiskave. V ponudbi posameznih proizvajalcev mikrobioloških gojišč je iz leta v leto širši nabor različnih

kromogenih gojišč, namenjenih izolaciji salmonel. Za ugotavljanje prisotnosti salmonel se lahko poleg klasičnih mikrobioloških poslužujemo tudi molekularnih metod.

## Material in metode

V raziskavi smo pregledali 58 vzorcev: 40 vzorcev mesa, od tega 38 vzorcev perutninskega izvora (15 - meso, 16 - pripravki – začinjeno oz. marinirano meso, 4 - kože, 3 - organi), 2 vzorca mesa drugega izvora in 18 vzorcev jajc. Vzorci mesa so bili naravno kontaminirani, medtem ko so bili vzorci jajc pripravljene za namen mednarodne medlaboratorijske kontrole. V vzorcih so bili prisotni različni serotipi salmonel: *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Seftemberg*. Prisotnost salmonel smo ugotavljali v 25g.

Uporabili smo postopke:

### 1. ISO 6579:2002

Predobogatitev v puferni peptonski vodi (PV) (Biokar), inkubacija 16-20 ur pri 37 °C; Obogatitev - prenos vzorcev iz pred-obogatitve v selektivno obogatitveno tekoče gojišče Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (RVS); inkubacija 24 ur pri 42 °C in gojišče Muller Kaufman tetratonat z novobiocinom (Biolife); inkubacija 24 ur pri 37 °C Nasajanje na selektivna trdna gojišča – XLD (Biolife) in gojišče po izbiri (npr. Rambach® Agar (Merck)); inkubacija 24 ur pri 37 °C Pregled plošč in potrditev tipičnih kolonij.

### 2. PCR v realnem času:

Izolacija nukleinske kisline s kitom High Pure PCR Template Preparation kit (Roche). PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi SalF/SalR in sondo SalTM (Daum in sod., 2002) in kitom TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

### 3. ISO 6579:2002, Anex D:

Iz pred-obogatitve v PV nanese 3 kapljice na poltrdno gojišče Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) ter plošče inkubiramo 24 in dodatno 24 ur pri 42 °C. V primeru opazne rasti gibljivih salmonel iz cone rasti (motno območje okrog kapljic) vzorce precepimo na XLD in npr. Rambach agar, inkubiramo 24 ur pri 37 °C, sledi pregled plošč in v primeru sumljivih kolonij potrditev.

### 4. Iz veje obogatitve preko RVS (ISO 6579) smo kot drugo (izbirno) gojišče poleg Rambach® agarja uporabili še:

- IRIS Salmonella® Agar (Biokar),
- Salmonella Chromogenic Agar (Conda)
- RAPID Salmonella Agar (BIO-RAD).

Vsa selektivna trdna gojišča smo inkubirali 24 ur pri 37 °C ter nato rast na ploščah ocenili.

### 5. Določanje stopnje kontaminacije vzorcev z metodo MPN: Vzorce (1g) smo inkubirali v 5 epruvetah z 9 mL PV. Po inkubaciji 16-20 ur pri 37 °C smo iz vsake epruvete vzorce precepili na RVS in inkubirali 24 ur pri 42 °C. Iz vsake epruvete smo vzorce precepili na plošče Rambach®, ter po inkubaciji ocenili rast. Vrednosti MPN smo ocenili iz MPN interpretacijskih tabel, ki ovrednotijo rezultat glede na kombinacijo pozitivnih/ uporabljenih testnih epruvet in mase testiranega vzorca.

Rezultati pridobljeni z referenčno metodo ISO 6579 oziroma ovrednoteni rezultati medlaboratorijske kontrole, so služili kot merilo (referenčni rezultati) za oceno dodatno testiranih postopkov. Glede na število testiranih pozitivnih in negativnih vzorcev za posamezen postopek smo izračunali občutljivost, specifičnost ter pozitivni in negativni odklon.





## Rezultati

Primerjali smo rezultate 58 vzorcev, pridobljene z različnimi postopki testiranja, z rezultati pridobljenimi z metodo ISO 6579. Rezultati in ovrednotenje intenzivnosti rasti na ploščah ob uporabi selektivnih trdnih gojišč po inkubaciji, so prikazani v Tabeli 1 in 2. V tabeli sta razvidna tudi parametra – občutljivost, specifičnost posameznega postopka ter negativni in pozitivni odklon. Stopnja kontaminacije pozitivnih vzorcev mesa je bila večinoma (12/19) nizka (<2 MPN/g). Visoka stopnja kontaminacije (>38 MPN/g) je bila ugotovljena pri enem vzorcu piščančjih kož, medtem, ko so bili drugi vzorci kontaminirani z manj kot 10 MPN/g. Vzorci jajc so bili inokulirani s *S. Enteritidis* v koncentraciji 11-110 CFU/vzorec (nizek nivo) in >65 CFU/vzorec (visok nivo).

## Razprava

Z metodo ISO 6579 smo prisotnost salmonel, ki predvideva dve veji obogatitve zaznali v 31 vzorcih. Ob obogatitvi preko RVS, je bila rast na posameznih ploščah boljša, vendar pri enem vzorcu v tej veji salmonela ni bila izolirana. To potrjuje upravičenost dvojne obogatitve z namenom izboljšanja občutljivosti metode. Občutljivost in specifičnost opisanih postopkov je bila dobra. Salmonela v enem primeru ni bila izolirana ob uporabi plošč RAPID *Salmonella* in pri enem vzorcu z molekularno metodo. Za potrditev vsaj 95% občutljivosti metode bi morali testirati vsaj 20 vzorcev. Tega števila za testni plošči Rapid *Salmonella* in Conda nismo dosegli, zato ocene ni mogoče podati.

Ob nasajanju že pripravljenih plošč IRIS *Salmonella*<sup>®</sup> (Biokar) iz obogatitve preko RVS, je bila ugotovljena občutljivost 100%. Tipične kolonije salmonel na tem gojišču so lepo vidne (vijolične barve na beli barvi gojišča) in zato gojišče ocenjujemo kot zelo prijazno za uporabo.

Metoda PCR v realnem času se je izkazala kot dobra metoda z občutljivostjo 98 % ter jo tudi zaradi krajšega časa, potrebnega za izvedbo postopka, ocenjujemo kot odlično presejalno metodo. V primeru pozitivnega rezultata je potrebno salmonele dodatno izolirati.

## Reference

- Daum LT, Barnes WJ, McAvin JC, in sod. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3050–52.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J* 2015; 13 (1): 3991.
- Uredba Evropskega parlamenta in sveta (ES) št. 178/2002 z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. UL L 31, 2002.
- SIST EN ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.. Geneve: International Organization for Standardization, 2002:1-27.
- Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila. UL L 338, 2005.

## Detection of *Salmonella* spp. – comparison of the methods

*Salmonella* spp. is food contaminant that can cause human diseases, particularly enterocolitis. Different methods and media can be used for detection in food. ISO 6579 is a reference method prescribed in Regulation (EC) No. 2073/2005. Results obtained by different methods or media used have been compared to the results obtained by the reference method. We used real-time PCR method, plating of pre-enrichment to Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar - MSR/V as described in ISO 6579 Annex D and plating after enrichment in Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (RVS) to IRIS Salmonella® Agar (Biokar), Salmonella Chromogenic Agar (Conda) and Rapid Salmonella agar (BIO-RAD). In total 58 samples have been tested: 40 meat samples and 18 samples of eggs. Sensitivity of 100% when IRIS Salmonella® Agar plates were used (25/25) and 98% by using real-time PCR (30/31) was determined.

Key words: *Salmonella* spp.; comparison of the methods; selective media; real-time PCR; food

# VALIDACIJA POSTOPKA UGOTAVLJANJA PRISOTNOSTI BAKTERIJE *Clostridium difficile* V VZORCIH SUROVEGA MESA

Majda Biasizzo\*, Stanka Vadnjal, Urška Henigman, Urška Jamnikar Ciglencečki

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Ljubljana, Slovenija

majda.biasizzo@vf.uni-lj.si

Bakterije *Clostridium difficile* povzročajo pri ljudeh različna obolenja, ki so mnogokrat povezana z bolnišničnim zdravljenjem in antibiotičnimi terapijami. Prenos teh bakterij preko živali, pri katerih so bile tudi izolirane, na živila in s hrano na ljudi, še ni potrjen. Podatki o kontaminaciji živil so zelo različni, kar je lahko povezano tudi z uporabo različnih postopkov dokazovanja. V naši raziskavi smo optimizirali in med seboj primerjali različne parametre pri postopku ugotavljanja prisotnosti bakterij *C. difficile* z molekularno metodo PCR v realnem času in izolacijo na trdnih gojiščih. Spreminjali smo čas obogatitve vzorcev, ter pri izolaciji obdelavo vzorcev po obogatitvi in uporabo trdnih gojišč. Najprimernejši izbrani postopek smo preverili na različnih vzorcih surovega mesa, vključno z začinjnim in mariniranim mesom. Mejo zaznavanja metode smo določili pri 5-10 cfu, kjer je bila občutljivost metode PCR v realnem času 100% in izolacija 96%. Izbrano metodo smo ocenili kot primerno za ugotavljanje prisotnosti bakterij *C. difficile* v vzorcih surovega mesa.

Ključne besede: *Clostridium difficile*, metoda izolacije in molekularne detekcije, živila, vzorci mesa, validacija postopka

## Uvod

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) je gram-pozitivna, sporogena, anaerobna bakterija, ki lahko povzroča različna obolenja pri ljudeh in živalih. Okužba lahko poteka brez kliničnih znakov, lahko pa se izraža kot driska, kolitis, v hujših primerih lahko celo vodi v perforacijo črevesja, sepsa in smrt (Rupnik in sod., 2009; Gauld in Limbago, 2010). Pri ljudeh je okužba s to bakterijo najpogostejši vzrok drisk pri bolnikih, ki so hospitalizirani, oziroma tistih, ki so zdravljeni z antibiotiki (Freeman in sod., 2010). Objavljene so številne študije, v katerih primerjajo seve, ki so bili izolirani pri ljudeh, pri živalih in iz živil, ter izpostavljajo možnost prenosa teh bakterij iz živali na ljudi preko živil (Rupnik in Songer, 2010). Bakterije *C. difficile* so bile izolirane iz različnih vrst živil, večinoma iz živil živalskega izvora. Podatki o stopnji kontaminacije so zelo različni in kažejo na občutno pogostejšo kontaminacijo živil v državah Severne Amerike (do 50%), v primerjavi z Evropo (do 5%) (Rupnik in Songer, 2010). Postopki ugotavljanja prisotnosti ter izolacije bakterije *C. difficile* tako pri testiranju kliničnega materiala, kakor živil so različni in zato izsledke teh testiranj težko primerjamo med seboj. V naši raziskavi opisujemo validacijo postopkov, s katerimi ugotavljamo prisotnost bakterij *C. difficile* - izolacijo iz vzorcev surovega mesa in mesnih pripravkov ter molekularno metodo PCR v realnem času.

## Material in metode

V prvi stopnji validacije smo pripravili vzorce mletega mesa (10 g) in jih do uporabe zamrznili pri  $-70^{\circ}\text{C}$ . Vzorce smo inokulirali s 3 različnimi sevi *C. difficile* v različnih koncentracijah. Uporabili smo seve: S1 - ATCC 9689, S2 - T7/MB izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri teletu, S3 - CD 400 izolat iz zbirke Veterinarske fakultete, izoliran pri prašiču.

Seve smo hranili anaerobno pri  $37^{\circ}\text{C}$  v gojišču - cooked meat medium (CMM) (Oxoid, VB). Da smo pripravili pričakovano nivo kontaminacije vzorcev, smo kulture razredčili ter desetim gramom mesa dodali ustrezen volumen bakterijske suspenzije. Da bi ugotovili ali razlike med sevi lahko vplivajo na uspešnost metode (sposobnost razmnoževanja v bujonu, ravnost na gojiščih), smo v tem poskusu inokulirali vzorce z vsakim sevom posebej. Za določitev meje zaznavanja postopka, smo pripravili 3 koncentracijske nivoje: 500-1000, 50-100, 10-50 cfu/vzorec in za vsako kombinacijo nivoja in seva po 2 vzorca. Kot kontrolo postopka smo ob vsaki seriji inokulacij vzorcev preverili tudi število bakterij v inokulumu. Vzoredno z vzorci mesa smo testirali posamezne seve v obogatitvenem bujonu brez mesa, vzorec ne-inokuliranega mesa ter vzorec samega obogatitvenega bujona. Skupno smo v prvi stopnji pripravili 33 vzorcev.

Vse vzorce smo obogatili v 90 ml gojišča TCCFB-CD+L, ki je sestavljen iz Cikloserin Cefoksitin fruktozega bujona (40 g/L proteoza pepton (Biolife), 5.0 g/L dinatrijevega hidrogen fosfata (Merck), 2.0 g/L natrijevega klorida (Merck), 0.1 g/L magnezijevega sulfata (Sigma-Aldrich), 6.0 g/L Fruktoze D (-)(F) (Fisher Scientific.), z dodatkom tauroholične kisline (Calbiochem), ter po avtoklaviranju še *Clostridium difficile* suplementa (Oxoid) in lizocima (Serva).

Vzorce smo inkubirali v anaerobnih pogojih (GENbox anaer, BIOMERIEUX), pri  $37^{\circ}\text{C}$  za 1, 4 in/ali 7 dni.

Po obogatitvi smo odvzeli vzorce za postopek PCR v realnem času in za izolacijo. Izolacijo s presajanjem na plošče smo izvajali direktno iz obogatitve vzorca in z nasajanjem sedimenta po obdelavi z 96% etanolom (1:1) in centrifugiranjem (4000g, 10 min). Vzorce smo nasadili na krvne plošče in plošče CCFA - *Clostridium difficile* agar base (Oxoid) ter jih 48 ur inkubirali anaerobno pri  $37^{\circ}\text{C}$ .

V drugi stopnji validacije smo uporabili vzorce različnih vrst mesa, vključili smo tudi začinjena in marinirana živila (Tabela 1). Skupno smo pregledali 25 različnih vzorcev, ki smo jih pripravili v dvojniku ter enemu dodali inokulum z bakterijsko kulturo *C. difficile*, drugemu pa ne. Inokulum smo pripravili v obliki koktajla vseh treh sevov, ki smo ga vzorcem dodali v volumnu, da smo dosegli koncentracijo *C. difficile* 5-20 cfu/vzorec. Glede na rezultate prve stopnje validacije smo v drugi stopnji za molekularno detekcijo uporabili 1 dnevno obogatitev pri  $37^{\circ}\text{C}$  v TCCFB-CD+L v anaerobnih pogojih, ter za izolacijo 4 oz. 7 dnevno obogatitev. Detekcijo in izolacijo smo izvedli po že opisanem postopku. Za izolacijo smo uporabili plošče CCFA in krvni agar.

## Rezultati

V prvi stopnji validacije smo z molekularno metodo PCR v realnem času prisotnost *C. difficile* v vseh treh koncentracijskih območjih ugotovili že po 1 dnevu obogatitve, medtem ko izolacija po 1 dnevu pri najvišji stopnji kontaminacije ni bila uspešna. Ko smo inkubacijo podaljšali na 4 oz. 7 dni, pa smo *C. difficile* izolirali iz vseh inokuliranih vzorcev. Pri nasajanju vzorcev direktno iz obogatitvenega bujona je bila stopnja detekcije občutno slabša kot po

centrifugiranju in nasajanju sedimenta. Izolacije vzorcev kontaminiranih s srednjo in nizko koncentracijo smo, glede na ugotovitve pri višjih koncentraciji, testirali po 4 in nato še po 7 dneh obogatitve. Izolacija *C. difficile* je bila pri inokuliranih vzorcih mesa v obeh primerih uspešna (12/12). Vendar pa je bila po 4 dneh slabša izolacija sevov, kjer ni bilo prisotnega mesa (5/6), medtem ko smo po 7 dneh uspešno izolirali *C. difficile*, a je bila rast na ploščah občutno šibkejša v primerjavi z rastjo, ko je bil bakterijski sev dodan k mesu.

Tabela 1: Rezultati validacije postopkov izolacije bakterije *C. difficile* v mesu in mesnih pripravkih, ocena rasti pri izolaciji ter ugotavljanje prisotnosti nukleinske kisline *C. difficile* z metodo PCR v realnem času (M - vzorec mesa; M+S1/S2/S3 – vzorec mesa inokuliran s sevom *C. difficile* S1, S2 ali S3; - negativno oz. ni rasti; + pozitivno oz. šibka rast; ++ dobra rast; +++ zelo dobra rast)

Št.	Vzorec	Vzorci brez dodatka					Vzorci z dodatkom kulture <i>C. difficile</i> (5-20cfu)						
		Obogatitev											
		1 dan		4 dni		7 dni		1 dan		4 dni		7 dni	
		qPCR	KA	TCC-FA	KA	TCC-FA	qPCR	KA	TCC-FA	KA	TCC-FA	qPCR	KA
1	Masa za čevapčiče	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+++		
2	Pleskavica	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+++		
3	Piščančje meso	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
4	Masa za čevapčiče	-	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+++		
5	Mariniran svinjski vrat	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
6	Piščančje meso	-	-	-	-	-	+	+++	++	+++	+++		
7	Piščančji vok	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
8	Piščančje meso	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
9	Piščančje meso	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
10	Piščančji vok	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++		
11	Mešano mleto meso	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++		
12	Čevapčiči	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++		
13	Začinjena piščančja krila	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+++		
14	Piščančje meso	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+		
15	Piščančje meso - file	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+		
16	Mleto meso	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++		
17	Piščančje meso - krače	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++		
18	Mleto meso	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+++		
19	Mleto meso	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
20	Piščančja nabodala	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++		
21	Piščančje nogice - polnjene	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++		
22	Mleto meso	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+++		
23	TCC-FB	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++		
24	TCC-FB	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++		
25	TCC-FB	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++		

V drugi stopnji validacije nismo dokazali prisotnosti *C. difficile* pri nobenem od neinokuliranih vzorcev, ne z uporabo molekularne metode PCR v realnem času, kakor tudi ne z metodo izolacije (Tabela 1). Izolacija po 4 dneh obogatitve (prvih 10 vzorcev) je bila sicer uspešna (10/10), vendar je bila rast pri nekaterih vzorcih šibka, medtem ko je bila po 7 dnevni obogatitve le-ta ocenjena kot zelo dobra (10/10). Izolacijo zadnjih 15 inokuliranih vzorcev smo izvedli le po 7 dneh obogatitve in je bila uspešna pri 93% vzorcev (14/15). Skupno je bila občutljivost ugotavljanja bakterij *C. difficile* z molekularno metodo PCR v realnem času 100%, pri izolaciji po 7 dneh obogatitve na krvnih ploščah 88% (22/25) ter z uporabo plošč CCFA 96% (24/25).

## Razprava

Z raziskavo smo želeli določiti ustrezen postopek za ugotavljanje prisotnosti kakor tudi za izolacijo bakterij *C. difficile*, ki bi ga v nadaljevanju uporabljali za določanje pojavljanja teh bakterij v vzorcih živil. Primerjali smo uspešnost molekularne metode (PCR v realnem času) in izolacije glede na različen čas obogatitve vzorcev (1, 4 in 7 dni). Poleg tega smo pri izolaciji primerjali tudi postopke nasajanja na trdno gojišče (krvni agar, CCFA) direktno iz obogatitvenega bujona ter s predhodno obdelavo z etanolom in centrifugiranjem.

Ugotovili smo, da za ugotavljanje prisotnosti z metodo PCR v realnem času zadošča že enodnevna obogatitev v TCCFB-CD+L medtem, ko ja za uspešno izolacijo potrebnih kar 7 dni obogatitve. Izolacija po obdelavi z etanolom in centrifugiranjem se je izkazala za uspešnejšo v primerjavi z direktnim nasajanjem iz obogatitvenega bujona. Uporaba selektivnih plošč CCFA se je v primerjavi z neselektivnim krvnim agarjem, zaradi manjšega števila motečih anaerobnih kontaminantov v vzorcih, izkazala kot boljša izbira. Z opisano metodo smo uspeli določiti prisotnost in izolirati *C. difficile* pri 96% (24/25) vzorcev pri testirani koncentraciji 5-10 cfu/vzorec, kar smo tudi določili za mejo zaznavanja naše metode.

Za namen nadaljnjih raziskav smo izbrali sledeč postopek:

1. stopnja: obogatitev 10g vzorca + 90 ml TCCFB-CD+L; 37°C; anaerobno
2. stopnja: po 1 dnevu obogatitve detekcija s PCR v realnem času
3. stopnja: po 7 dneh obogatitve – izolacija:  
obdelava z 96% etanolom (1:1) 30 min;  
centrifugiranje 4000g 10 min;  
nasajanje sedimenta po odstranitvi tekočine na plošče CCFA;  
inkubacija 37°C anaerobno 2 dni

## Reference

Freemen J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorthuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 529–49.

Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? Clin Infect Dis. 2010; 51: 577-82.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 2009; 7: 526-536.

Rupnik M, Songer JG. *Clostridium difficile*: Its potential as a source of foodborne disease. Adv Food Nutr Res 2010; 60: 53–66.

## Validation of *Clostridium difficile* detection from meat samples

*Clostridium difficile* cause various human diseases often associated with hospital treatment and antibiotic therapies. Transmission of those bacteria through animal reservoirs and food to the people has not been confirmed yet. Data about food contamination varies widely and can be the result of different detection methods used. In our study we have optimized the molecular detection method and the isolation on solid media, regarding the enrichment time. In addition different sample treatment after enrichment and different isolation plates were used. Our optimised protocol was tested using raw meats of different origin, including spiced and marinated. The limit of detection for our method of isolation and detection of *C. difficile* out of meat samples was set at 5-10 CFU per sample, with the 100% sensitivity for qPCR and 96%.for isolation.

Key words: *Clostridium difficile*, detection and isolation method, food, meat samples, validation

# DETECTION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN BOVINE MILK FOLLOWING MASTITIS TREATMENT

Aleksandar Siljanoski<sup>1</sup>, Renata Ciglarič<sup>2</sup>, Tomaž Pezdir<sup>2</sup>, Tanja Knific<sup>2</sup>, Ksenija Šinigoj-Gačnik<sup>2\*</sup>

University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Ljubljana, Slovenia

ksenija.gacnik@vf.uni-lj.si

The purpose of this study was to check tetracycline residues in milk from treated mastitic quarters. Milk from 35 cows, which were intramammary treated with a preparation containing tetracycline, was collected before and after the withholding period. Twinsenor, a competitive receptor-based test was used for quick detection of tetracycline residues. The positive samples were analyzed with LC-MS/MS. In none of the untreated quarters tetracycline residues were detected. In 40% of the milk from treated quarters tetracycline residues were above Maximum Residue Limit after the withdrawal period. In 11.4% the concentration of tetracycline was above the 700 µg/kg. The withholding period stated in the label of the medicinal product is determined in healthy animals and only for that particular medicinal product. During mastitis the conditions in the quarter are different, the production of milk usually decreases, and thus the excretion time can differ compared with a healthy animal. From the treatment records, we could see that sometimes the treatment was extended, always more than one antimicrobial product were used, and the withholding time was prolonged.

Key words: Tetracycline, milk, residues, mastitis

## Introduction

The tetracycline group of antibiotics counts around 10 members of which oxytetracycline, chlortetracycline, and demethylchlortetracycline occur naturally. Chlortetracycline and oxytetracycline were the first members of the tetracycline group discovered in the 1940s as products of *Streptomyces aureofaciens* and *S. rimosus*. They exhibit broad-spectrum of activity against gram-negative and gram-positive bacteria, as well as some other microorganisms such as chlamydia, mycoplasmas, rickettsia, and protozoan parasites. Tetracyclines inhibit protein synthesis in bacteria by reversible binding to 30S ribosomal subunit, and specifically at the aminoacyl-tRNA acceptor ("A") site on the mRNA ribosomal complex preventing ribosomal translation. In veterinary medicine tetracyclines are used in cattle for treating general, respiratory, urinary, local infections and infectious mastitis. Intramammary route of application of tetracyclines is a frequent source of milk contamination. Tetracyclines are not recommended for children up to the age of 6-8 years and by pregnant women because of the risk of developing secondary tooth discoloration (Chopra I et al, 2001).

To prevent harmful health effects Maximum Residual Limits (MRLs) are established. According to Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances the MRL for oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), and tetracycline (TTC) in milk is set to 100 µg/kg.



The purpose of this study was to check tetracycline residues in milk from treated mastitic quarters.

## Material and methods

Milk samples from 35 treated mastitic cows in lactation were collected from various farms in the following manner:

- one milk sample before the beginning of the treatment for determination of the type of bacteria,
- after the treatment samples were taken two milkings before and two milkings after the withdrawal period set by the attending veterinarian,
- from each milking one sample was collected from the treated mastitic quarter and one from an untreated healthy quarter.

Total of 9 samples were collected per cow. The samples for antibiotic analysis were kept at -20°C until analysis. The sample for determining the agent was kept at 4 – 8°C and analyzed within 24 hours.

The attending veterinarians provided us with information about the treatment of the animal.

The samples for determination of the cause of mastitis were plated on blood agar and incubated at 37°C. Determination of the agent was done the next day with Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF).

All milk samples were analyzed first with Twinsensor kit, a competitive receptor-based test, for rapid detection of tetracycline residues. The sensitivity limit of the test was 80-100 µg/kg for tetracycline. All milk positive samples after withdrawal period, together with the samples before the withdrawal period, were analyzed with Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for tetracycline identification and quantification.

## Results

In the milk samples from the untreated quarters tetracycline were not found. In 18 out of 35 cases (51,4%) milk samples from treated mastitic quarters contained tetracycline after the withdrawal period. But in only 14 cases (40,0%) MRL was exceeded.

## Discussion

Mastijet Fort was the only medicinal product used by the veterinarians that contained tetracycline. It is composed of: tetracycline (200 mg), neomycin (250 mg), bacitracin (2000 IU) and prednisolone (10 mg). Its recommended withdrawal period is 96 hours or 8 milkings and its recommended dosage is one injector per quarter every 12 hours, with a maximum of four treatments. From the treatment records that we received from the attending veterinarians we could see that Mastijet Fort was sometimes used 6 treatments in a row. However, Mastijet Fort was never applied alone, it was usually administered in a combination with other products. According to the European Medicine Agency guidelines, "Time To Safe Concentration" is used for the determination of withdrawal periods. Nonetheless, prolonged usage of preparations or increased doses during mastitis is not taken into consideration (EMA/CMVP/473/98-final).

In our cases different, longer withdrawal periods ranging from 4 to 7 days (9 – 14 milkings) were prescribed. In 14 cases the MRL was exceeded in the milk from treated quarters after the withdrawal period of 10, 12, 13, and 14 milkings.

If we take into consideration the concentration of tetracycline in the total milk volume from one animal, the concentration would decline due to the dilution effect with the milk from the other untreated quarters. Thus, it is expected the final concentration of tetracycline to reach probably level below the MRL. Hypothetically, if one quarter is treated, the final concentration of the drug in the total milk volume from a cow would be 25% regarding the milk from the untreated quarter. Considering this calculation, only in 4 cases MRL was exceeded. The concentrations of tetracycline in milk from the treated quarters after the withdrawal period were 701, 718, 749, 750 µg/kg, and the corresponding quantities in the milk from all four quarters were 175, 179, 187, and 187 µg/kg, respectively. The prescribed withdrawal periods were 12, 13, 12, and 10 milkings, respectively. In three of these cases milk production dropped. The presence of tetracyclines in milk in Czech Republic was reported by Navratilova. Tetracycline has been detected in all bul tanks and tanker trailers. However, the concentration of tetracycline in all samples was below the MRL (Navratilova P et al, 2009).

There are few articles that state prolonged excretion of antibiotics in milk from treated cows with mastitis. During mastitis physical and chemical changes in the milk and in the mammary gland occur, which have the potential to alter the distribution of intramammary drugs. The milk-duct system may also be compressed in an extremely swollen udder or obstructed by inflammatory product, thus resulting in poor or uneven drug distribution (Gehring R et al, 2006).

## References

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001; 65(2):232-260.

European Medicines Agency (EMA) – Committee for Veterinary Medicinal Products: Note for guidance for the determination of withdrawal periods for milk. EMEA/CMVP/473/98-final.

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004496.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004496.pdf) (01.05.2016).

Gehring R, Smith GW. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J Vet Pharmacol Therapy*, 2006; 29:237-241.

Navratilova P, Borkovcova I, Dračková M, Janštova B, Vorlova L. Occurrence of Tetracycline, Chlortetracyclin, and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk. *Czech J Food Sci*, 2009; 27(5):379-385.

# UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI VIRUSA HEPATITISA E V VZORCIH BLATA POGINJENIH PRAŠIČEV V LETIH OD 2011 DO 2015 V SLOVENIJI

Ivan Toplak\*<sup>1</sup>, Danijela Rihtarič<sup>1</sup>, Smiljka Barlovič<sup>2</sup>, Petra Raspor Lainšček<sup>3</sup>, Andrej Kirbiš<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Murska Sobota, <sup>3</sup>Inštitut za varno hrano, krmo in okolje Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V letih od 2011 do 2015 smo na prisotnost nukleinske kisline virusa hepatitisa E (HEV) z metodo RT-PCR v realnem času preiskali 566 individualnih vzorcev blata poginjenih prašičev. HEV smo v blatu prašičev dokazali v povprečju pri 8,83% vzorcev. Najnižji odstotek HEV pozitivnih vzorcev smo dokazali v letu 2013 (4,21%), najvišjega pa v letu 2014 (12,50%). V pozitivnih vzorcih smo z metodo RT-PCR v realnem času ugotavljali vrednosti Ct med 23 in 40, kar odraža ugotovitev od velikih do nizkih količin HEV v blatu pozitivnih prašičev. Čeprav HEV pri prašičih ne povzroča klinične slike, je prisotnost virusa v blatu poginjenih prašičev dokaz, da HEV kroži v slovenskih rejah prašičev. Zaradi možnosti prenosa HEV iz prašičev na človeka, ne smemo podcenjevati razširjenosti teh okužb.

Ključne besede: Virus hepatitisa E; dokazovanje; RT-PCR v realnem času; blato prašiča; prašič

## Uvod

Virus hepatitisa E (HEV) ima enojnovijačno pozitivno polarno molekulo RNA. HEV je uvrščen v rod *Hepevirus*, družine *Hepeviridae*, znotraj rodu pa so HEV razvrščeni v štiri genotipe. Viruse genotipa 1 in 2 ugotavljajo predvsem v manj razvitih državah, kjer je HEV endemično prisoten, izbruhe in epidemije pri ljudeh pa največkrat povezujejo s fekalno onesnaženostjo pitne vode. Okuženi ljudje so naravni gostitelj teh dveh genotipov HEV, prenosi med ljudmi pa so posledica neizvajanja preventivnih ukrepov in slabih higienskih razmer. Okužbe z virusi genotipa 3 in 4 ugotavljajo pri človeku tako v razvitih, kot tudi v nerazvitih državah. Prisotnost HEV genotipa 3 in 4 so dokazali tudi pri številnih živalskih vrstah, domači in divji prašič pa sta naravna gostitelja (1). Okužba s HEV genotipa 3 in 4 pri ljudeh povzroča akutni hepatitis s smrtnostjo <1%, pri nosečnicah pa smrtnost dosega 28% (1). S filogenetskimi primerjavami sevov HEV, ugotovljenih pri prašičih in človeku, so nedvoumno dokazali prenos HEV med obema vrstama (2). V industrijsko razvitih državah so okužbe s HEV sporadično zaznane, se pa število zaznanih primerov okužb ljudi v ZDA in Evropi povečuje, posebej pri delavcih, ki so v neposrednem stiku s prašiči. V Sloveniji smo protitelesa in virus dokazali tako pri domačih kot divjih prašičih (3, 4). Z izvedeno študijo smo želeli ugotoviti prisotnost HEV v vzorcih blata poginjenih prašičev in spremljati morebitno pojavljanje okužb pri domačih prašičih v daljšem časovnem obdobju.

## Material in metode

V petih letih, od 2011 do 2015, smo vzorčili blato prašičev, ki so poginili v starosti od 2 do 5 mesecev. Večina vzorčenih prašičev je iz območja severovzhodne Slovenije, kjer se nahaja največje število rej in je najvišja gostota prašičev v Sloveniji. Pri patološki sekciji smo od posameznega prašiča odvzeli približno 10 cm debelega črevesa in ga do testiranja v laboratoriju shranili v zamrzovalniku. Iz vsebine črevesa smo pripravili 10% suspenzijo in izolacijo RNA izvedli s komercialnim kompletom QIAamp® viral RNA Mini (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Nukleinsko kislino HEV smo dokazovali z metodo RT-PCR v realnem času. Pri tem smo uporabili reagente Superscript™ III Platinum® One-Step RT-PCR System with ROX (Invitrogen, ZDA) in specifične oligonukleotidne začetnike ter sondo za dokaz virusov HEV genotipov 1-4, kot je bilo predhodno opisano (5). Rezultat posameznega vzorca smo ovrednotili kot pozitiven, v kolikor smo dobili vrednost Ct nižjo od 40, oziroma negativen pri vzorcih, pri katerih nismo ugotovili specifičnega pomnoževanja.

## Rezultati

Z metodo RT-PCR v realnem času za dokaz nukleinske kisline HEV smo od leta 2011 do leta 2015 preiskali skupno 566 vzorcev blata poginjenih prašičev. Prisotnost virusne nukleinske kisline HEV smo dokazali v najnižjem odstotku v letu 2013 (4,21%), najvišji odstotek pozitivnih vzorcev pa v letu 2014 (12,50%). V spremljanem obdobju petih let smo ugotovili v povprečju 8,83% pozitivnih vzorcev na HEV (Tabela 1). V pozitivnih vzorcih smo z metodo RT-PCR v realnem času ugotavljali zelo različne količine virusne nukleinske kisline, glede na dobljene vrednosti Ct med 23 in 40. Ti rezultati dokazujejo, da je bil HEV stalno prisoten v zadnjih 5 letih v slovenskih prašičjih rejah, uporabljena metoda in vzorci blata prašičev pa predstavljajo dober sistem za ovrednotenje pojavljanja HEV prašičih.

Tabela 1: Število pregledanih vzorcev blata poginjenih prašičev na prisotnost HEV z metodo RT-PCR v realnem času v posameznem letu od 2011 do 2015 in odstotki vzorcev v katerih smo dokazali prisotnost nukleinske kisline HEV

Leto	Število preiskanih vzorcev	Število negativnih vzorcev	Število pozitivnih vzorcev	Odstotek pozitivnih vzorcev na HEV
2011	57	50	7	12,28%
2012	162	143	19	11,72%
2013	190	182	8	4,21%
2014	40	35	5	12,50%
2015	117	106	11	9,40%
Skupaj	566	516	50	8,83%

## Razprava

V izvedeni študiji smo ugotavljali prisotnost HEV v naključno odvzetih vzorcih blata poginjenih prašičev. Čeprav je bil HEV pri prašičih v Sloveniji prvič dokazan že leta 2008 in tudi kasneje, pa so te študije zajemale le posamezne reje ali manjše število vzorcev.

Dokazovanje HEV v zajetem petletnem obdobju je prva tovrstna študija pri nas, ki potrjuje stalno prisotnost okužb s HEV pri domačih prašičih. Glede na to, da izločanje HEV v blatu prašičev traja od 20 do 120 dni po okužbi, je ugotovitev 10% pozitivnih vzorcev v starostni skupini od 2 do 5 mesecev starih prašičev pričakovan rezultat, ki potrjuje ugotovljeno stanje v drugih državah. Ker sta domači in divji prašič rezervoar HEV, je potrebno to upoštevati tudi v Sloveniji, v okviru preventivnih ukrepov javnega zdravja. Čeprav pozitivnih vzorcev v študiji nismo genetsko tipizirali, je glede na splošno razširjenost HEV genotipa 3 v Evropi in predhodne tipizacije pri nas, stalna prisotnost HEV dokaz, da virus ves čas kroži v naših prašičjih rejah. HEV spada med zoonoze, okužbe s HEV pa so s strani epidemiologov ter humanih diagnostičnih laboratorijev še vedno prepogosto spregledane. Čeprav je pri človeku klinično zaznavnih akutnih primerov malo, pa so okužbe s HEV lahko posebej nevarne za nosečnice, zato je potrebna posebna previdnost, da se nosečnice ne izpostavljajo v rejah prašičev, oziroma so previdne pri uživanju termično neobdelanih izdelkov iz prašičjega mesa.

## Reference

1. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140: 256-265.
2. Xia H, Wahlberg N, Belak S, meng XJ, Liu L. The emergence of genotypes 3 and 4 hepatitis E virus in swine and humans: a phylogenetic perspective. *Arch Virol* 2011; 156: 121-124.
3. Lainšček Raspor P, Toplak I, Kirbiš A. Detection of hepatitis E virus in faeces and liver of pigs collected at two Slovenian slaughterhouses. *Mac Vet Rev* 2013; 36: 97-100.
4. Žele D, Barry AF, Hakze-van der Honing RW, Vengušt G, van der Poel VHM. Prevalence of the anti-hepatitis E virus antibodies and first detection of hepatitis E virus in wild boar in Slovenia. *Vector-born Zoonot Dis* 2016; 71-74.
5. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Meth* 2006; 131: 65-71.

## The detection of hepatitis E virus in feces samples of dead pigs in the period from 2011 to 2015 in Slovenia

Between years 2011 and 2015 a total 566 individual feces samples of dead pigs were examined for the detection of nucleic acid of hepatitis E virus (HEV) by real time RT-PCR method. In the five-year follow-up period the presence of HEV was demonstrated in an average of 8,83% of feces samples. The lowest percentage of HEV positive samples was detected in year 2013 (4,21%) and the highest in 2014 (12,50%). The cycle threshold values obtained by real time RT-PCR method for positive samples varied from 23 up to 40, reflecting the presence from high to low quantities of HEV in feces. Although HEV does not cause clinical picture of the disease in pigs, the presence of the virus in the feces of dead pigs confirmed that HEV is circulating in Slovenian pig farms. These infections can not be underestimated because of the potential transmission of HEV from pigs to humans.

Key words: Hepatitis E virus; detection; real-time RT-PCR; pig feces, pig

# **Infekcijske bolezni in diagnostika**

Infectious diseases and  
diagnostic

---

# BOLEZEN MODRIKASTEGA JEZIKA V SLOVENIJI

Aleksandra Grilc Fajfar, Tadej Malovrh\*

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

tadej.malovrh@vf.uni-lj.si

Bolezen modrikastega jezika (BT) je bolezen domačih in prosto živečih prežvekovalcev. Je nenalezljiva virusna bolezen, ki jo povzroča *Orbivirus* in se prenaša preko vektorjev, krvosesnih mušic iz rodu *Culicoides*. Poznani so številni načini prenosa bolezni, vključno preko okuženih kulikoid, s pasivnim prenosom okuženih kulikoid z vetrom, okužba se lahko širi tudi z uporabo okuženih injekcijskih igel, kljub temu pa pri nekaterih izbruhih bolezni še vedno nimamo ustrezne razlage glede širjenja določenega serotipa BTV. Diagnostika bolezni BT temelji na encimsko imunskih testih (ELISA) in molekularni diagnostiki. Z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času po že objavljenem protokolu v testu z ustrezno izbranimi začetnimi oligonukleotidi in s fluorofori označeno Taqman sondo specifično dokazujemo segment 1 genoma pri različnih serotipih virusa BT.

Prispevek opisuje prvi primer bolezni BT v Sloveniji pri govedu, pri katerem smo dokazali okužbo s serotipom BTV-4. V začetku novembra 2015 smo s serološkimi metodami pri živali dokazali prisotnost protiteles proti virusu BT, v sredini novembra pa smo z molekularnimi metodami dokazali in potrdili prvi primer bolezni modrikastega jezika v Sloveniji.

Ključne besede: bolezen modrikastega jezika; laboratorijska diagnostika; prvi pojav bolezni

## Uvod

Bolezen modrikastega jezika (BT) je virusna bolezen predvsem ovac in goveda in tudi drugih domačih ter divjih parkljarjev, lahko pa zbolijo tudi domači in divji mesojedi. Je kužna nenalezljiva bolezen, ki se ne prenaša z direktnim stikom iz ene bolne živali na drugo. Bolezen povzroča virus RNA iz družine *Reoviridae*, rod *Orbivirus*. V vrsti virusa BT danes razlikujemo 27 genetsko različnih serotipov, med katerimi se v našem delu Evrope pojavljajo predvsem tipi 1, 4, 8 in 16. Med dovzetnimi živalmi se virus prenaša z biološkimi vektorji iz skupine krvosesnih žuželk iz rodu *Culicoides*, ko med sesanjem v ranico vnesejo nekaj okužene slin. Ko okuženi rod mušic na okuženem območju zaradi vremenskih razmer propade (zima in nizke temperature, huda suša in visoke temperature), se na tem področju bolezen ne širi več. Za naslednjo generacijo mušic, ki še ni nosilec virusa, bodo izvor virusa latentno okužene živali določenega področja. Bolezen se lahko razširi med dovzetnimi živalmi tudi z okuženo spermo in z embriotransferjem, mesojedi pa se lahko okužijo s prehranjevanjem z ostanki okuženih živali. Imunski sistem dovzetnega gostitelja se odzove na virusne proteine ali na antigene iz cepiva s proizvodnjo protiteles, ki so za vsakega izmed 27 tipov specifična, kar je temelj laboratorijske serološke diagnostike bolezni. Bolezen modrikastega jezika je bila prvič bolj strokovno opisana leta 1902 v Južni Afriki, znanstveni pristop k opisu bolezni pa sega v leto 1952. Bolezen je danes razširjena po večjem delu sveta, novembra leta 2015 pa je bila prvič laboratorijsko diagnosticirana tudi v Sloveniji.

## Material in metode

Monitoring BT v Sloveniji se od leta 2006 izvaja skladno s programom, ki ga vsako leto pripravi UVHVVR. Na terenu veterinarji odvzamejo vzorce krvi za serološke ali molekularne preiskave in jih dostavijo na VF/NVI, ki opravi laboratorijsko testiranje in o rezultatih poroča UVHVVR. Serološka diagnostika bolezn modrikastega jezika temelji na dveh ELISA, presejalnem (Ingenasa, Ingezim BTV DR (1.2. BTV. K0) in potrditvenem testu (IDEXX, Bluetongue Virus (BTV) VP7 Antibody Test Kit). Oba testa se izvajata v virološkem laboratoriju VF/NVI. Skladno s predpisi proizvajalcev testov se opravi zaporedje postopkov ter interpretacija rezultata.

V primeru pozitivnega rezultata potrditvene ELISA pa je v skladu z navodili Odredbe potrebno živalim odvzeti še kri za preiskavo na prisotnost virusnega povzročitelja bolezn BT (kri z antikoagulantom EDTA).

## Rezultati

V letu 2015 smo v virološkem laboratoriju testirali 9183 serumskih vzorcev goveda in drobnice. 202 vzorca sta bila v testih ELISA pozitivna, zato smo opravili še molekularno testiranje na prisotnost virusnega genoma. Novembra 2015 smo v okviru rednega letnega monitoringa iz reje govedi v občini Murska Sobota v preiskavo prejeli 42 serumskih vzorcev govedi. V 3 vzorcih smo s presejalnim in potrditvenim ELISA dokazali prisotnost protiteles proti virusu BT. V skladu s programom in z navodili Odredbe 2015 je bila živalim naknadno odvzeta še kri z antikoagulantom, v kateri smo samo pri dveh živalih 18.11.2015 dokazali genom virusa bolezn modrikastega jezika. Naš rezultat je 25.11.2015 potrdil tudi Evropski referenčni laboratorij iz Pirbrighta, Velika Britanija. Ugotovljen virus je pripadal serotipu 4. Konec avgusta leta 2016 pa se je na področju Ilirske Bistrice prvič v Sloveniji pojavil klinični sum bolezn pri dveh ovcah, kar je bilo potrjeno tudi z laboratorijskimi metodami. Kasneje je bilo v laboratoriju potrjenih še več primerov BT na podlagi kliničnih sumov.

## Razprava

Slovenija je do jeseni 2015 veljala za »oazo«, kjer bolezen modrikastega jezika še ni bila dokazana tako klinično, kot tudi ne v laboratoriju. Do novembra 2015 so prav vse sosednje države že obravnavale posamezne izbruhe BT. Vzroke, da se je Slovenija znašla v tako ugodni situaciji lahko pripišemo specifični legi Slovenije, saj se zaradi geografsko južnejših vstopnih točk virusa v sosednje države in posledično zaradi izvajanja ukrepov, širjenje virusa proti severu, v smeri proti Sloveniji, močno omeji. V precej nepojasnjenih okoliščinah se je v oktobra leta 2014 pojavil izbruh BT serotipa 4 v sosednji Madžarski, razmeroma blizu slovenske meje, kar je predstavljalo povečano verjetnost za pojav bolezn v Sloveniji. UVHVVR je na ogroženih območjih predpisala intenzivnejši monitoring. Bolezen na podlagi laboratorijskih testov ni bila dokazana vse do konca sezone prenašalcev v letu 2014, kot tudi ne preko večine leta 2015. Ugodni vremenski pogoji (zelo topla in vlažna jesen s konstantnim SZ vetrom) so omogočili razvoj kulikoid kakor tudi njihovo širjenje iz Madžarske proti Sloveniji in Avstriji. Časovno pravilno načrtovan monitoring je obrodil sadove, saj smo po predhodno pozitivnih rezultatih seroloških preiskav prvič z molekularnimi metodami dokazali virusni genom. Naj omenimo še zanimivost, da so na področju tromeje med Avstrijo, Madžarsko in Slovenijo, v krogu 25 kilometrov v razmaku nekaj ur pred nami dokazali izbruh bolezn tudi v Avstriji. Praktično sočasen dokaz izbruha bolezn potrjuje pravilno zastavljen program



monitoringa. Avgusta 2016 se je v Sloveniji pojavil prvi klinični primer BT, ki so mu sledili še drugi v mesecu septembru. Pojav bolezni na področju Ilirske Bistrice bi težko neposredno povezovali s pojavom bolezni 2015, vendar ne gre izključiti možnosti prenosa bolezni iz jugo vzhodne smeri, iz Bosne preko precepljene Hrvaške.

Vsekakor pa je izbruh BT v letu 2015 izzval resnejša vprašanja o potrebi po zaščitnem cepljenju proti BTV-4. Cepljenje je eden od zelo učinkovitih načinov preprečevanja bolezni, vendar pa cepiva proti vsem do danes poznanim serotipom niso na voljo. Na podlagi analize epidemiološke situacije leta 2015 in po strokovni oceni smo na VF/NVI podali mnenje, da cepljenje vseh dovzetnih živalih ni primerno zaradi nezmožnosti ločevanja protiteles, ki bi nastala zaradi okužbe z »divjim sevom« virusa in tistimi, ki so posledica cepljenja. Groba analiza je namreč pokazala majhno verjetnost pojava bolezni in majhne škode ob pojavu bolezni. Predlagali smo individualni pristop rejcev k cepljenju tistih živali, ki so namenjene prodaji, za nadaljnjo rejo v drugih področjih države ali za izvoz. Epidemiološka situacija v letu 2016 je sicer nekoliko spremenila pogled na obvezno cepljenje vseh dovzetnih živali, vendar imamo glede na zaznано umrljivost in obolevnost pri pojavi bolezni v 2016 na VF/NVI še vedno pomisleke glede ekonomske upravičenosti t.i. masovnega cepljenja proti BT v Sloveniji.

## Reference

1. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res*, 39(5):46.
2. OIE (2014). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: Office International des Epizootics, 1-18.
3. Maan NS, Maan S, Belaganahalli MN, Ostlund EN, Johnson DJ, Nomikou K, Mertens PPC (2012). Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT-PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *PLoS One*, 7(2):e32601.
4. Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future (2009). *Phil Trans R Soc B*, 364: 2669-2681.
5. Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, Guercio A, Alimena G, Vitale M, Bankowska K, Carpenter S, Jones H, Oura CAL, King DP, Elliott H, Mellor PS, Mertens PPC (2007). Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *J Virol Methods* 145:115-126.

## Bluetongue in Slovenia

Bluetongue (BT) is a disease of domestic, captive and free-ranging ruminants caused by bluetongue virus (BTV), a non-contagious vectorborne *Orbivirus*. BTV is transmitted between its ruminant hosts by hematophagous midges of the genus *Culicoides*.

A number of different mechanisms have been involved in the introduction process, among them the movement of infected livestock, the passive movement of infected *Culicoides* on the wind, transmission by needle sharing during subcutaneous inoculation, although some outbreaks may reflect lack of knowledge about the distribution of the BTV serotypes.

Current diagnosis of BTV infection relies upon enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of nucleic acid by a real-time RT-PCR assay based on a TaqMan fluorescence probe and a set of primers was used to detect the BTV genome segment 1 of different BTV serotypes, according to published protocol from Shaw et alia.

---

This study described the very first report of BTV-4 in Slovenia. Serological evidence occurred in cattle in the beginning of November and in the middle of November molecular identification of the first BTV case in Slovenia was confirmed.

Key words: bluetongue; laboratory diagnostics; first evidence of disease

# PRISOTNOST VIRUSA PRRS PRI POGINJENIH PRAŠIČIH V OBDOBJU OD 2011 DO 2016 V SLOVENIJI

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Marina Štukelj<sup>2</sup>, Danijela Rihtarič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Klinika za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V letih od 2011 do 2016 smo preiskali skupno 2.053 vzorcev poginjenih prašičev na dokaz nukleinske kisline virusa PRRS z metodo RT-PCR. Virus PRRS smo dokazali v posameznih letih v 17,59 do 27,38% preiskovanih vzorcev. Ti rezultati dokazujejo, da so bile okužbe z virusi PRRS v zadnjih 6. letih v slovenskih prašičjih rejah stalno prisotne, bolezen pa je endemično razširjena. Ugotavljanje prisotnosti virusa PRRS v poginjenih prašičih je lahko pomemben pokazatelj o razširjenosti, vztrajanju in oceni stanja boleznih PRRS v rejah. Rezultati izvedene študije ne dajejo veliko upanja za hitro izboljšanje stanja PRRS v Sloveniji, v kolikor bistveno ne bomo spremenili pristopa nadzora in zatiranja PRRS.

**Ključne besede:** Virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma; prevalenca, dokazovanje; RT-PCR: prašič

## Uvod

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) je virusna bolezen, ki je razširjena v skoraj vseh državah, kjer se ukvarjajo s prirajo prašičev. Slovenija je bila do vstopa v Evropsko unijo prosta PRRS (1). Prisotnost virusa in kroženje velikega števila genetsko različnih sevov PRRS, smo v Sloveniji v okuženih rejah prvič dokazali leta 2009 (2). V izvedeni študiji leta 2010 smo pregledali 210 vzorcev prašičev in dokazali prisotnost virusa v 45,2% vzorcev (3). V posameznih rejah smo več let spremljali stanje boleznih PRRS in uspešno izvedli tudi nekaj sanacij ter preprečili ponoven vnos virusa v rejo (4). Za sanacijo boleznih se je odločilo le malo rejcev, zato se bolezen še naprej ohranja v rejah. Največkrat se virus PRRS v neokuženo rejo vnese z nakupom okužene živali. Okužba reje z virusom PRRS povzroča reprodukcijske motnje pri svinjah (poveča se število mrtvorojenih, slabotnih in razkremenjenih pujskov, pregonitve, podaljšano je obdobje do ponovne ovulacije, prisotna je agalakcija), pri ostalih kategorijah pa se pojavljajo respiratorne motnje, pogini in slabši prirast, kar povzroča velike ekonomske škode (5). Okužbo v reji lahko dokažemo iz različnih vrst vzorcev (serum, slina, različni organi), najpogosteje pa sta za dokaz prisotnosti virusa uporabljeni metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) in metoda RT-PCR v realnem času, ki omogočata dokazovanje prisotnosti virusne nukleinske kisline, z njima pa je mogoče izvesti tudi hitro razlikovanje virusov PRRS tipa 1 in 2 (2). Namen študije je bil ugotoviti prisotnost pozitivnih poginjenih prašičev na virus PRRS in ovrednotiti pogostost pojavljanja v obdobju od leta 2011 do 2016.

## Material in metode

V okviru nadzora boleznih v rejah prašičev s klinično sliko, sumljivo na PRRS (abortusi, šibki pujski, reje s težavami v reprodukciji in pogini pujskov s pljučnicami), smo v letih od 2011 do 2016 vzorčili različne organe (pljuča, bezgavke, vranica, ledvica) poginjenih prašičev. Skupno smo pregledali 2.053 vzorcev. Za izolacijo RNA iz vzorcev smo uporabili komercialni komplet QIAamp® viral RNA Mini (Qiagen, Nemčija) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Za izvedbo RT-PCR smo pripravili reakcijsko mešanico z reagenti kompleta QIAGEN® OneStep RT-PCR (Qiagen, Nemčija) in specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za dokaz virusov PRRS tipa 1 in 2, kot je bilo predhodno opisano (2). Rezultate smo ovrednotili kot pozitivne oziroma negativne na podlagi prisotnosti oziroma odsotnosti produkta RT-PCR specifične velikosti.

## Rezultati

S specifično metodo RT-PCR za dokaz nukleinske kisline virusa PRRS smo v letih od 2011 do 2016 preiskali skupno 2.053 vzorcev poginjenih prašičev (Tabela 1). Specifični produkt RT-PCR v velikosti 300 nukleotidov, smo dokazali v 505 vzorcih, kar prikazuje tabela 1. Ti rezultati dokazujejo, da so okužbe z virusi PRRS v zadnjih 6. letih v slovenskih prašičjih rejah stalno prisotne, bolezen PRRS pa je endemično razširjena.

Tabela 1: Število pregledanih vzorcev poginjenih prašičev na prisotnost virusa PRRS z metodo RT-PCR v posameznem letu od 2011 do 2016<sup>#</sup> (#zajeti so le podatki do meseca maja 2016) in odstotek vzorcev v katerih smo dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS

Leto	Število preiskanih vzorcev	Število negativnih vzorcev	Število pozitivnih vzorcev	Odstotek pozitivnih vzorcev na virus PRRS
2011	455	331	124	27,25%
2012	383	282	101	26,37%
2013	432	356	76	17,59%
2014	321	234	87	27,10%
2015	347	252	95	27,38%
2016 <sup>#</sup>	115	93	22	19,13%
Skupaj	2.053	1.548	505	24,59%

## Razprava

Po izvedeni študiji leta 2010, boleznih PRRS v Sloveniji nismo več sistematično spremljali, zato je podatkov o pojavljanju in razširjenosti okužb z virusom PRRS v naslednjih letih malo. Po vnosu virusa PRRS v rejo se poslabša dobrobit prašičev, poslabšajo se proizvodnji parametri in pride do porasta endemičnih boleznih, zato je okužene reje potrebno čim prej sanirati ali izvajati specifične preventivne ukrepe in načine nadzora boleznih, da bi čim bolj zmanjšali škode. Po potrditvi PRRS v Sloveniji v letu 2009, sanacije okuženih rej z virusom PRRS nismo sistematično izvedli na nacionalnem nivoju. So se pa nekateri rejci sami in s pomočjo različnih pristopov ter strokovnjakov lotevali zatiranja boleznih, vendar v večini primerov neuspešno. Posledično se prav gotovo, tudi zaradi nekontroliranega vnosa novih

virusov in pomanjkljivega nadzora ter zatiranja okužb z virusi PRRS, pri nas iz leta v leto stalno zmanjšuje prireja domačih prašičev. Pri testiranih poginjenih prašičih v letih od 2011 do 2016, smo v tej študiji ugotovili v povprečju četrtno pozitivnih vzorcev na virus PRRS v posameznem letu. Dokaz virusa pri poginjenem prašiču pomeni tudi neposredni dokaz prisotnosti in kroženje virusa PRRS v reji, iz katere poginjen prašič izhaja. Rezultati tudi potrjujejo, da je bolezen v zadnjih šestih letih endemično prisotna in je prav gotovo pomembno prispevala k povečanju poginov prašičev v okuženih rejah. Spremljanje prisotnosti virusa PRRS v poginjenih prašičih pa je lahko pomemben pokazatelj glede razširjenosti, vztrajanja in ocene stanja boleznih PRRS v rejah. Vnos nepregledanih in hkrati pozitivnih prašičev na PRRS v reje še poslabšuje zdravstveno stanje v intenzivni prašičereji. Ti podatki ne dajejo veliko upanja za hitro izboljšanje stanja PRRS v Sloveniji, v kolikor bistveno ne bomo spremenili pristopa za nadzor in zatiranje PRRS skupaj z drugimi boleznimi.

## Reference

1. Valenčak Z. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Slovenia: Evaluation of serology. *Slov Vet Res* 2004; 41(2): 99-101.
2. Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Štukelj M, Valenčak Z. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J Virol Meth* 2012; 179: 51-56.
3. Toplak I, Štukelj M, Zabavnik Piano J, Hostnik P, Grom J, Valenčak Z. *Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2010: 1-40.
4. Štukelj M, Toplak I, Valenčak Z. An attempt to eliminate porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) by serum inoculation on small pig farm. *Slov Vet Res* 2013; 50: 193-200.
5. Zimmerman J, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorell M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) In: Straw BE, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Iowa state University Press. 2006; 387-417.

## The presence of PRRS virus in the period from 2011 to 2016 in the dead pigs in Slovenia

Between 2011 and 2016, a total 2.053 samples of dead pigs were examined by RT-PCR method for the detection of nucleic acids of PRRS virus. During this period the presence of PRRS virus was demonstrated from 17,59 to 27,38% of the investigated samples. These results confirm that the infection with PRRS virus was constantly presented in the last 6 years in Slovenian pig farms and the disease is now endemically present. Detection of the presence of PRRS virus in dead pigs can be an important indicator of the prevalence, the persistence and the evolution of the PRRS in pig farms. These data do not give much hope for rapid improvement of the situation of PRRS in Slovenia if we will not substantially change the approach towards the control and eradication of PRRS.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; prevalence; detection; RT-PCR; pig

# LEJŠMANIOZA: PRELIMINARNI REZULTATI SEROPREVALENCE PRI PSIH V SLOVENIJI

Brane Krt, Aleksandra Vergles Rataj, Igor Gruntar, Tina Kotnik\*

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

tina.kotnik@vf.uni-lj.si

Lejšmaniozo pri psih in pri ljudeh povzročajo protozoji iz rodu *Leishmania*, od katerih je najpomembnejša vrsta *L. infantum*. Prenašalci so samice peščenih muh iz družine *Psychodidae*, poddružina *Phlebotominae*. Klinično se lejšmanioza pri psih kaže s kožnimi spremembami (vozlički na gobcu, nosu, uhljih ter ekfoliativni dermatitis z nenormalno rastjo krempljev) in sistemskimi spremembami (anoreksija, anemija, mišična atrofija, poliartropatija, generalizirana limfadenopatija, konjunktivitis, blefaritis, anteriorni uveitis in keratokonjunktivitis ter spontane krvavitve, zlasti krvavitve iz nosu). Pri atipični obliki bolezni je opisanih še mnogo simptomov, izraženih na različnih organskih sistemih. Z imunofluorescenčno metodo smo preiskali 110 naključno izbranih serumskih vzorcev psov iz različnih krajev Slovenije, odvzetih od sredine leta 2014 do maja 2016. V 6 vzorcih (iz krajev Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru in Lenart v Slovenskih goricah) smo dokazali protitelesa, tri vzorce pa smo ocenili kot sumljive (iz Ankarana, Ljubljane in Doba-Krtine) vendar je število preiskanih vzorcev v naši raziskavi premajhno, da bi lahko bolj zanesljivo ocenili stopnjo seroprevalence lejšmanioze pri psih v Sloveniji. Posredno smo dokazali prisotnost povzročitelja. Nedavno so ugotovili prisotnost peščenih muh na območju slovenske Istre, zato je le še vprašanje časa, kdaj bomo ugotovili prve primere endemične lejšmanioze pri ljudeh in živalih v Sloveniji.

Ključne besede: lejšmanioza; psi; seroprevalenca; Slovenija

## Uvod

Lejšmanioza je vektorsko prenosljiva bolezen, ki jo povzročajo protozojski paraziti iz rodu *Leishmania*. V rodu je približno 30 vrst, od katerih je 20 patogenih za ljudi, 10 pa za pse. Najbolj razširjena in raziskana je okužba z vrsto *L. infantum*, ki povzroča okužbe psov in drugih kanid ter ljudi. Prenašalci so nematocerne žuželke, samice peščenih muh iz družine *Psychodidae*, poddružina *Phlebotominae*. Na področju Evrope so to predstavniki rodu *Phlebotomus*. Lejšmanioza je bila ugotovljena tudi pri mačkah (1), konjih (2), lisicah, kojotih in glodavcih. Pri naštetih vrstah živali bolezen ugotavljamo razmeroma redko, pomemben rezervoar pa v zadnjem času postajajo glodavci, saj je bila pri podganah v endemičnem področju (južna Italija) ugotovljena skoraj 60% seroprevalenca (3). Peščene muhe se okužijo z zaužitjem krvi vretenčarjev, invadiranih z amastigoti parazita (oblika brez bička, značilna za vretenčarje). V črevesju muh se iz amastigotov izoblikujejo promastigoti (bičkaste oblike protozoja, velikosti 10-12  $\mu\text{m}$ ), ki se razmnožujejo z vzdolžno delitvijo. Kopičijo se v slinskih žlezah muhe. Ob piku samice peščene muhe vnesejo promastigote v kri vretenčarja. Promastigoti odvržejo biček in jih kot amastigote, velike 2-3  $\mu\text{m}$ , fagocitirajo makrofagi. V njih se z vzdolžno delitvijo ponovno razmnožujejo in raznesejo po organizmu gostitelja.

Okuženi makrofagi занесеjo amastigote v regionalne bezgavke. Od tod naprej je izid okužbe pri psih odvisen od mnogih dejavnikov, ki se nanašajo na prenašalca (ponavljajoči se piki okuženih samic peščene muhe), zajedavca (virulenca) in gostitelja (genetska podlaga, celična in humoralna imunost s proizvodnjo citokinov, vzporedne bolezni). Od teh dejavnikov je odvisno, ali se bo okužba razvila v klinično obliko bolezni ali ne. Parazite lahko imunski odziv gostitelja v bezgavkah uniči (samoozdravitev), lahko ostanejo omejeni le na kožo in bezgavke (nediseminirana in običajno asimptomatska okužba), ali pa se s pomočjo makrofagov razširijo po telesu (diseminirana okužba), kar ima spet lahko za posledico klinične znake bolezni (simptomatska okužba), ali pa kliničnih znakov ni (diseminirana asimptomatska okužba). Nedvomno je pojav klinične oblike bolezni verjetnejši po več sezonah, ki jih psi na endemičnih področjih preživijo ponoči na prostem. Okuženi psi so pomembni kot rezervoar bolezni. Pri ljudeh se okužba z *L. infantum* kaže predvsem v visceralni obliki (visceralna lejšmanioza, VL), ki je smrtno nevarna bolezen, če je ustrezno ne zdravimo.

Tradicionalna endemična področja bolezni v EU so v državah Mediteranskega bazena (Portugalska, Španija, Francija, Italija, Hrvaška, Bolgarija, Romunija, Grčija in Ciper), z incidenco okrog 700 novih primerov VL letno pri ljudeh. Izven EU je bolezen razširjena na vseh kontinentih, razen na Antarktiki in v Avstraliji. V zadnjih letih beležimo širjenje endemičnih področij severno od obstoječih, najverjetneje zaradi globalnega segrevanja in povečanega gibanja živali na območja ter z območij, kjer je bolezen endemična. Okužbe pri ljudeh so dokazane v Avstriji, centralnem delu Francije in Nemčiji, od koder poročajo tudi o okužbi otroka, ki ni nikoli potoval v znana endemična območja. V Dalmaciji so bili prvi primeri lejšmanioze pri ljudeh in živalih ugotovljeni že leta 1930. Od leta 1997 beležijo naraščanje primerov lejšmanioze pri psih. Seroprevalenca pri zdravih psih, ki živijo na endemičnih področjih EU, se giblje od 5-43% kar pomeni, da je na teh območjih lahko okuženih med 40-80% psov. Nedavne entomološke raziskave na Hrvaškem so dokazale prisotnost dveh vrst vektorjev okužbe, *Phlebotomus neglectus* in *P. tobbi*; prvi je mnogo bolj zastopan (75,9%) in pogostejši tam, kjer so psi (4). Nedavno so ugotovili tudi serološko pozitivne primere pri ljudeh, ki živijo v Istri.

Klinično se lejšmanioza pri psih kaže s kožnimi spremembami na mestu vboda insekta (vozličaste lezije, najpogosteje jih najdemo na gobcu, nosu in notranji strani ušes), nesrbečim eksfoliativnim dermatitisom (po raznosu zajedavca z makrofagi), pogosta je tudi nenormalna rast krempljev (onihogrifoza). Anoreksija se pojavi zaradi kronične ledvične odpovedi in ta je tudi glavni vzrok smrti pri psih, obolelih za lejšmaniozo. Psi so videti utrujeni, potrti in šibki, kar so posledice anemije, mišične atrofije in poliartropatije. Pogost simptom lejšmanioze je generalizirana limfadenopatija, značilne so tudi spremembe na očeh v obliki konjunktivitisa, blefaritisa, anteriornega uveitisa in keratokonjunktivitisa ter spontane krvavitve, zlasti iz nosu. Pri atipični obliki bolezni je opisanih še mnogo simptomov, izraženih na različnih organskih sistemih.

Na klasičen način dokazujemo povzročitelja s citološko preiskavo izpirkov ali odtisov ulcerativnih sprememb, aspiratov (tankoigelna biopsija) nodulov ali krvnih razmazov, pri čemer v makrofagih iščemo amastigote. Serološka diagnostika (imunofluorescenčni in encimskoimunski test) je najzanesljivejša pri živalih z izraženimi simptomi bolezni, manj pri asimptomatsko okuženih. Če pregledujemo poginjeno žival, iz vzorcev jeter, vranice in kostnega mozga naredimo razmaze za citološko preiskavo oziroma odvzamemo tkivo za patohistološko preiskavo. Sicer pa se za dokaz povzročitelja v zadnjem času vse bolj uporabljajo molekularne metode (PCR).

Namen našega dela je bil ugotoviti seroprevalenco pri psih iz različnih krajev Slovenije in na osnovi tega sklepati na prisotnost lejšmanije. To je skladno tudi s priporočili European Food Safety Authority (5).

## Material in metode

Z imunofluorescenčno metodo smo preiskali 110 naključno izbranih serumskih vzorcev psov iz različnih krajev Slovenije: Ankaran, Bistrica ob Dravi, Bled, Brestanica (2 vzorca), Brezovica pri Ljubljani, Brusnice, Celje, Črni kal, Črnomelj, Dob-Krtina, Dobova, Dobrova (2), Dolenjske Toplice, Domžale (2), Dutovlje, Grosuplje (3), Ilirska Bistrica, Ivančna Gorica, Jesenice (2), Kamna Gorica, Kamnica (2), Kamnik (3), Kobarid, Kočevje, Komenda, Koper (3), Kranj (2), Križe (2), Križevci pri Ljutomeru (2), Lenart v Slovenskih goricah, Ljubljana (9), Log pri Brezovici, Logatec, Lokev, Lukovica pri Brezovici, Mačkovci, Mala Nedelja, Maribor (4), Marjeta na Dravskem polju, Markovci pri Ptujju, Mavčiče, Novo mesto (2), Postojna, Pragersko, Preddvor, Preserje pri Brezovici (2), Ptuj (3), Radovljica (3), Ribnica, Selnica ob Dravi, Sežana (2), Sp. Besnica, Sp. Duplek, Stahovica, Starše, Šenčur, Šentilj, Šentvid pri Stični, Škofja Loka (2), Škofljica, Šmarje Sap, Tenetiše, Trbovlje, Trzin (2), Trzič, Velenje (2), Verd, Videm Dobrepolje, Vir, Višnja Gora, Vodice, Zg. Besnica in Zg. Jezersko. Te vzorce smo sicer prejeli v preiskavo zaradi suma na lymsko boreliozo in/ali granulocitno anaplazmozo, od sredine leta 2014 do maja 2016. Test smo izvedli na komercialno pripravljenih stekelcih (Leishmania-Spot IF, Biomerieux, Francija), skladno z navodili proizvajalca. Antipasji FITC konjugat (Sigma, ZDA) smo redčili 1:32. Kot pozitivne smo ocenili tiste vzorce, pri katerih je bila reakcija pozitivna pri redčenju 1:50.

## Rezultati

Med 110 preiskanimi serumi je bilo 6 pozitivnih, in sicer iz krajev Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru in Lenart v Slovenskih goricah. Tri vzorce smo ocenili kot sumljive, poslani pa so bili iz Ankarana, Ljubljane in Doba-Krtine.

## Razprava

V raziskavi smo uporabili vzorce, ki so bili poslani v preiskavo za druge namene (boreliosa, anaplazmoza). Zato podatkov o morebitnih kliničnih znakih, ki bi jih lahko povezali z lejšmaniozo, in podatkov o potovanju teh psov v endemična področja, nimamo. Naš namen je bil ugotoviti seroprevalenco pri psih iz različnih krajev Slovenije in na osnovi tega sklepati na prisotnost lejšmanije, ki se bo ob selitvi peščene muhe proti severu lahko začela prenašati tudi znotraj države. Nedavno objavljena raziskava, narejena na območju hrvaške in slovenske Istre, namreč dokazuje prisotnost petih vrst peščenih muh na tem območju (*Phlebotomus neglectus*, *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. mascitii*, *Sergentomyia minuta*). Našli so jih predvsem v okolici divjih smetišč, kjer so našli tudi podgano, okuženo z *L. infantum* (3). V preiskanih peščenih muhah na območju slovenske Istre raziskovalci sicer niso ugotovili prisotnih zajedavcev, vendar je znano, da je peščena muha vrste *P. neglectus* najpomembnejša in najpogostejša prenašalka zajedavca *L. infantum*. Dolgoletne izkušnje držav z endemično obliko lejšmanioze in številne raziskave kažejo, da je za prenos zajedavca, poleg prisotnosti vektorjev na določenem območju, pomembna predvsem koncentracija okuženih ljudi in živali. Ko število okuženih psov doseže določeno koncentracijo, se prične endemični prenos bolezni. Vse več objav pa navaja kot možen rezervoar bolezni tudi mačke in glodavce. Število preiskanih vzorcev v naši raziskavi je sicer premajhno, da bi lahko bolj zanesljivo govorili o stopnji seroprevalence lejšmanioze v Sloveniji, posredno pa smo dokazali prisotnost okuženih psov. V državah z dolgoletno endemično obliko bolezni ugotavljajo, da je razmerje med simptomatsko okuženimi psi in asimptomatskimi prenašalci bolezni lahko do 1:100.



Države Evropske unije, ki mejijo na države z endemično obliko bolezni (mednje sodi tudi Slovenija), imamo možnost zaježitve širjenja endemične oblike lejšmanioze. To lahko storimo s pomočjo izobraževanja in rednega obveščanja veterinarjev in zdravnikov, hitrega ugotavljanja in zdravljenja bolezni pri živalih in ljudeh, ozaveščanja lastnikov živali, preprečevanja širjenja vektorjev bolezni ter končno tudi zaščitnega cepljenja psov. V nekaterih državah EU je že registrirano cepivo za pse (CaniLeish, Virbac Animal Health), ki se je v dosedanjih raziskavah izkazalo za učinkovito tako pri preprečevanju okužbe kot tudi profilaktično, saj so uspeli s cepljenjem bolnih psov konvertirati njihov imunski status v bolj učinkovit celični imunski odziv, ki lahko prepreči visceralno obliko bolezni.

## Zaključek

Glede na dejstvo, da vedno več lastnikov psov s svojimi živalmi potuje v endemična območja in glede na uvoz okuženih psov z endemičnih področij, prisotnost vektorjev bolezni in spremembe klime, je samo še vprašanje časa, kdaj bomo tudi v Sloveniji začeli beležiti prve primere endemične lejšmanioze pri ljudeh in živalih. Opozorjanje veterinarske in medicinske stroke na ugotovljena dejstva je torej upravičeno.

## Reference

1. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2008; 8: 555–60.
2. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R et al. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 2003; 35: 320–3.
3. Ivović V, Kalan K, Zupan S, Bužan E. Illegal waste sites as a potential micro foci of mediterranean leishmaniasis: first records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Slovenia. *Acta Veterinaria Beograd* 2015; 65 (3): 348-57.
4. Živičnjak T, Martinković F, Houry C et al. Serological and entomological studies of canine leishmaniasis. *Vet. arhiv* 2011; 81: 99-110
5. EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2015. Scientific Opinion on canine leishmaniasis. *EFSA Journal* 2015; 13(4): 4075

## Leishmaniasis: preliminary results of seroprevalence in dogs in Slovenia

Canine Leishmaniasis (CanL) and human visceral leishmaniasis (VL) cause protozoa from genus *Leishmania*. The most important species is *L. infantum*. Vectors are sand flies from *Psychodidae* family, subfamily *Phlebotominae*. CanL is presented by skin symptoms (nodules on the muzzle, nose, pinnae, exfoliative dermatitis with onichogryphosis) and general health changes (anorexia, anemia, muscle atrophy, poliartropathy, generalised lymphadenopathy, conjunctivitis, blepharitis, anterior uveitis, keratoconjunctivitis and spontaneous nasal bleeding). Serum specimens of 110 dogs, living in different parts of Slovenia, were collected from mid of year 2014 till May 2016 and tested by immunofluorescent method. Six positives were found (living in Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru and Lenart v Slovenskih goricah). Three specimen, sent from Ankaran, Ljubljana and Dob-Krtina, were marked as suspicious. Number of tested specimen is too low that authors would be able to estimate CanL seroprevalence

---

in Slovenia. Nevertheless, *L. infantum* was indirectly proven. Since presence of important vectors was reported from slovenian Istria region recently, authors would like to stress the matter of time until the first endemic CanL or VL case in Slovenia will be reported.

Key words: leishmaniosis; CanL; dogs; seroprevalence; Slovenia



**Osnovne raziskave v  
veterinarstvu**

Basic studies in veterinary  
medicine

---

# APPLICATIONS OF THE HYBRIDISATION BASED NANOSTRING TECHNOLOGY

Sarah Juel Paulsen<sup>1</sup>, Jane Nøhr Larsen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Imaging, <sup>2</sup>Department of Incretin Biology, Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark

[jnql@novonordisk.com](mailto:jnql@novonordisk.com)

Gene expression analysis of tissue samples with low RNA content has been proven to be challenging using traditional technologies such as qPCR and microarrays.

The NanoString technology is a new hybridisation based multiplex technology allowing up to 800 genes to be investigated in one single reaction with an RNA demand of 100 ng or less

We have compared the results obtained with the NanoString Technologies nCounter<sup>®</sup> platform with the data obtained using qPCR in general applications using traditionally purified RNA, but also with a specific focus on low content RNA applications, where we have combined the NanoString technology with laser capture micro dissection. These combined technologies allowed us to investigate gene expression from very specific cellular populations derived from brain and other tissues. The background for the Nanostring technology and examples of different applications will be presented.

# NARAVNI NAČINI ZATIRANJA PARAZITOV

Kristina Dolinar Paulič\*, Mojca Rep, Velentina Križnjak, Vanja Meža, Aljaž Zadavec

Biotehniška šola Maribor, Maribor, Slovenija

kristina.dolinar-paulic@guest.arnes.si

Namen našega dela je bil prikazati antihelmintski učinek tinkture, ki smo jo izdelali iz dvanajstih zelišč. Poprovo meto, komarček, timijan, plezajočo lakoto, kamilico, kajenski poper, česen, pravi pelin, ingver, cimet, sabljasti triplat in golostebelni sladki koren smo namočili v domače žganje in po enem mesec u precedili. Pripravku smo dodali še 40- odstotno glukozo. Aplicirali smo ga v hrano sedemnajstim konjem, petim teletom in šestim bikom. Pripravek smo aplicirali 5 dni zaporedoma v odmerku 0,1 ml/kg telesne teže na dan.

Živali so pripravek rade zaužile. Med aplikacijo ni bilo opaziti nikakršnih stranskih učinkov, ki bi jih povzročil pripravek. Izboljšala se je celo prebava in konsistenca iztrebkov. Pripravek je bil 100-odstotno učinkovit proti parazitom *Oxyuris equi*, *Parascaris equorum*, *Anoplocephala spp.*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris ovis*, *Neoascaris vitulorum*. Pripravek je bil manj učinkovit na *Strongilidae* in *Eimerio*. V primerjavi z antiparazitiki na slovenskem tržišču je naš pripravek cenovno sprejemljivejši, lastniki živali pa ga lahko izdelajo tudi sami.

Ključne besede: paraziti; antiparazitiki; zelišča; tinktura; živali

## Uvod

Zaradi poškodb, degeneracije sklepov, izgube zob, mišične slabosti rastlinojede živali le redko dosežejo maksimalno starost, saj zaradi oslabeledosti pred tem postanejo lahek plen mesojedov. Udomačitev je prinesla določene prednosti, hkrati pa tudi slabosti. Med prednosti štejemo hrano in vodo, ki sta vedno na voljo, potem toplo zavetje, zaščito pred vremenskimi vplivi, plenilci, veterinarsko oskrbo (oskrba zob, kontrola nad paraziti ...) in oskrbo parkljev ter kopit.

V divjini se živali pasejo na enem mestu, potem pa se pomaknejo naprej, kjer urinirajo in defecirajo. V naravi iščejo rastline z antiparazitskim delovanjem, še posebej med migracijo parazitov. Zelišča, ki imajo antihelmintski učinek, ustvarjajo v črevesju okolje, ki ni primerno za parazite. Pri pripravi mešanic zeliščnih pripravkov moramo paziti, da uporabimo hkrati zelišča, ki pomirjajo prebavni sistem (golostebelni sladki koren), zmanjšajo kolike ali spazem gladkih mišic (meta, kamilice) in pomagajo pri odpravljanju parazitov z njihovim odvajalnim delovanjem (regratove korenine, aloe vera, plantana, kodrolistna kislica). Da zmanjšamo invadiranost s paraziti, lahko v prehrani živali uporabljamo tudi naribano korenje, semena pegastega badlja, buč, melon, granatnega jabolka in sončnic. Vse to čisti črevesno steno in ustvarja neprimerno okolje za črve. Česen je glavni antiparazitik. Njegovo eterično olje vsebujejo alicin, za katerega je klinično dokazano, da je učinkovito sredstvo proti večini nematodov. Pravi pelin tudi vsebuje tujon in je učinkovito sredstvo proti nematodom in askaridom. Timijan vsebuje timol, ki ima antiseptičen, antibakterijski in antihelmintski učinek. (Page, 2005; Wells, 2005; Wynn in Fougere 2007)

## Material in metode

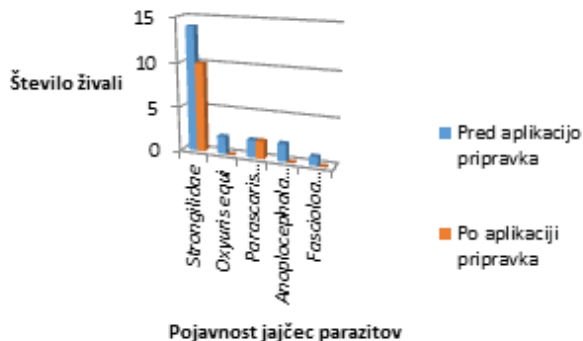
Za zatiranje notranjih zajedavcev smo izbrali dvanajst zelišč (poprova meta, ingver, kamilica, kajenski poper, timijan, plezajoča lakota, cimet, česen, sabljasti triplat, komarček, golostebelni sladki koren, pravi pelin). Vsa smo stresli v domače sadno žganje, zmešali in pustili en mesec. V štiri litre žganja smo namočili 100 g poprove mete, 2 čajni žlički kajenskega popra, 40 g česna, 100 g kamilice, 100 g sabljastega triplata, 10 g ingverja, 100 g komarčka, 100 g timijan, 100 g golostebelnega sladkega korena, 100 g pravega pelina, 100 g plezajoče lakote in 40 g cimeta. Po enem mesecu smo pripravek razredčili s tremi litri 40-odstotne raztopine glukoze. Pripravek smo aplicirali sedemnajstim konjem, šestim teletom in petim bikom. En mesec pred aplikacijo pripravka in en mesec po njem smo s koprološkimi metodami ugotavljali v iztrebkih prisotnost jajčec in ličink zajedavcev.

## Rezultati

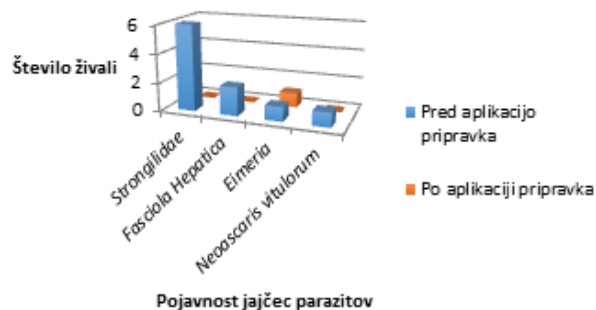
Pripravek je 100-odstotno odpravil *Oxyuris equi* ter *Acantocephalo spp.* ter *Fasciolo hepatico*. Pri dveh konjih je odpravil tudi *Parascaris equorum*. Na strongilide je imel manjši učinek.

Pri govedu je pripravek 100-odstotno deloval na *Fasciolo hepatico*, *Strongilidae*, *Neoascaris vitulorum*. Na Eimerio pripravek ni imel učinka. Živali so pripravek rade zaužile, konzistenca iztrebkov ni bila spremenjena. Nezaželenih stranskih učinkov lastniki niso opazili.

Grafikon 1: Učinek tinkture pri konjih



Grafikon 2: Učinek tinkture pri govedu



Vir: Križnjak, Meža, Zdravec, 2015, str. 42–45.

Vir: Križnjak, Meža, Zdravec, 2015, str. 42–45.

## Razprava

Izdelali smo tinkturo, ki pri živalih odpravlja notranje zajedavce. Njen učinek je primerljiv s kemičnimi pastami in je cenejši od njih. Pripravek nima karence, je izdelan iz samih naravnih sestavin in je zaradi tega predvsem primeren tudi za uporabo na ekoloških kmetijah. Raziskava je potrdila, da je naš pripravek odpravil naslednje parazite (*Oxyuris equi*, *Parascaris equorum*, *Anoplocephala spp.*, *Fasciolo hepatico*, *Trichuris ovis* in *Neoascaris vitulorum*). Na strongilide in eimerio je bil pripravek manj učinkovit. Pri živalih se je izboljšala prebava in konzistenca iztrebkov. Pri teletih invadiranih z glisto *Neoascaris vitulorum* je lastnik po aplikaciji antiparazitika opazil, da so ta v iztrebkih začela izločati veliko število odraslih glist. Z intenzivnim kmetovanjem se je na travnih površinah zmanjšala prisotnost številnih zelišč, tudi takih, ki vsebujejo protizajedavske učinkovine. Tako bi moral biti vnos

določenih zelišč v telo nujen za njihovo zdravo življenje. Naravno sredstvo za preprečevanje zajedavcev ugodno vpliva na prebavo, je cenejše za lastnika in enostavno za pripravo. Pripravek je zelo primeren za ekološke kmetije.

## Reference

Križnjak V, Meža V, Zadavec A. Izdelava naravnega pripravka za zatiranje notranjih zajedavcev pri živalih. Inovacijski predlog. 49. Srečanje mladih raziskovalcev Slovenije. Maribor 2015.

Page H. Vetaran horse herbal. Hilary Page Self 2005. Buckingham: 82–84.

Wells A. Integrated Parasite Management for Organic Dairy Cattle. NODPA News. May 2005: 16–18.

Wynn S.G, Fougere B.J. Veterinary herbal medicine. Mosby elsevier 2007: 327–328.

## Natural methods of controlling parasites

The purpose of our work was to demonstrate the anthelmintic effect of the tincture, which was made from twelve herbs. Peppermint, fennel, thyme, goosegrass, chamomile, cayenne pepper, garlic, wormwood, ginger, cinnamon, fenugreek and liquorice was soaked in homemade brandy and filtered after one month. 40 % glucose was added to the tincture and was administered in the diet of seventeen horses, six calves and five bulls. It was administered for 5 days at dose of 0,1 ml/kg body weight per day. Animals tend to eat product. During the application, there was no evidence of side effect of the tincture. We noticed improved digestion, appetite and consistence of faeces. The tincture was 100 % effective against parasites *Oxyuris equi*, *Parascaris equorum*, *Anoplocephala spp.*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris ovis*, *Neoascaris vitulorum*. The tincture was less effective against *Strongylidae* and *Eimeria*. Our product is cheaper than the other antiparasitics. Animal owners can make it themselves.

Key words: parasites; antiparasitic agents; herbs; tincture; animals



# SPOLNO SPECIFIČNO ZNOTRAJCELIČNO SPOROČANJE V MATIČNIH CELICAH SAMCEV IN SAMIC PSOV PO AKTIVACIJI INZULINSKEGA RECEPTORJA S POMOČJO METODE BRET<sup>2</sup>

Kaja Blagotinšek<sup>1,2#</sup>, Eva Knuplež<sup>1,3#</sup>, Milka Vrecl<sup>1</sup>, Luka Mohorič<sup>1,4</sup>, Gregor Majdič<sup>1,4</sup>, Katerina Čeh<sup>1,4</sup>,  
Valentina Kubale Dvojmoč<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, <sup>2</sup>CFGBC, Medicinska fakulteta, <sup>3</sup>Fakulteta za farmacijo, <sup>4</sup>Animal d.o.o.,  
Ljubljana, Slovenija

#obe avtorici sta enakovredno prispevali in si delita prvo avtorstvo

valentina.kubaledvojmoč@vf.uni-lj.si

Zdravljenje sklepnih obolenj živali z matičnimi celicami smo med prvimi v klinično prakso uvedli na Veterinarski fakulteti v Ljubljani. V okviru evropskega projekta smo proučevali spolni dimorfizem matičnih celic psov, pridobljenih iz maščobnega tkiva, predvsem morebitne razlike v znotrajceličnem sporočanju po aktivaciji inzulinskega receptorja (IR) *in vitro*. Za prikaz razlik v interakciji z  $\beta$ -arestinom 2 ( $\beta$ -arr2) po aktivaciji IR z inzulinom smo uporabili metodo bioluminiscenčnega prenosa resonančne energije (BRET<sup>2</sup>). Rezultati so pokazali, da je pri samicah vidna bistveno višja razlika v odzivu po stimulaciji z agonistom. Potrditev različne aktivacije inzulinskega receptorja v celicah samcev in samic, je pomembna za razumevanje bolezni, kot sta debelost in sladkorna bolezen. Razumevanje spolnega dimorfizma nam v prihodnosti lahko omogoča razvoj glede na spol usmerjene terapije.

Ključne besede: matične celice; BRET<sup>2</sup>; spolni dimorfizem

## Uvod

Matične celice so celice, ki se lahko razvijejo v različne telesne celice. Tekom embrionalnega razvoja so ključnega pomena za normalen razvoj različnih tkiv in organov, medtem ko imajo v odrasli dobi vlogo nadomeščanja poškodovanih ali odmrlih specializiranih celic. Potencial uporabe matičnih celic je velik, saj jih je možno uporabljati za preizkušanje varnosti novih zdravil in predvsem kot vir za razvoj celic ter tkiv za uporabo celične terapije. Transplantacija obolelih tkiv in organov danes omogoča nadomeščanje obolelih tkiv pri boleznih kot so osteoartritis, nevrodegenerativne bolezni, bolezni srca, sladkorna bolezen, idr. V Sloveniji je v veterinarski medicini že na voljo zdravljenje bolezni sklepov, kit in vezi psov ter konjev (1, 2).

S tehnologijo BRET preučujemo medsebojne interakcije dveh specifično označenih proteinskih partnerjev. *Renilla luciferaza* (RLuc) se uporablja kot bioluminiscentna oznaka, za fluorescentno pa služi mutanta GFP-ja EYFP ali mutantna oblika zeleno fluorescirajočega proteina GFP<sup>2</sup>. V prisotnosti substrata Coeletrazina, RLuc oddaja svetlobo z vrhom pri 480 nm. Če pride do interakcije med primerno orientiranima proteinoma RLuc in EYFP pride do pojava BRET, kar vidimo kot emisijo svetlobe z vrhom pri 526 nm. Luminiscenca nastane zaradi

katalitične razgradnje substrata z luciferazo, kar omogoči ekscitacijo EYFP-ja in posledično fluorescenco. Metoda BRET je bila pred kratkim z željo po boljšem ločevanju specifičnega signala od ozadja izboljšana z razvojem druge generacije tehnologije BRET, ti. metode BRET<sup>2</sup>. Pri metodi BRET<sup>2</sup> se kot donorska oznaka uporablja RLuc8, kot akceptorska oznaka pa GFP<sup>2</sup>. GFP<sup>2</sup> ima prilagojen ekscitacijski spekter za to valovno dolžino (ekscitacija pri 395 nm), kar ob predpostavki, da sta fuzijska konstrukta na GFP<sup>2</sup> in RLuc8 na maksimalni razdalji 100 Å, omogoča dobro spektrofotometrično ločevanje emisije donorja (395 nm) in akceptorja (~410 nm) in tako zmanjša problem ozadja ter s tem poveča občutljivost metode (3,4).

## Material in metode

### *Pridobivanje matičnih celic*

Veterinar živali v splošni anesteziji odvzame majhen košček maščobnega tkiva, običajno na področju hrbta, v našem primeru pri psih. Iz odvzetega maščobnega tkiva se v laboratoriju osamijo mezenhimske matične celice, ki jih je potrebno namnožiti, kar običajno traja sedem do dvanajst dni. Celice se po potrebi tudi zamrznejo. Alikvote matičnih celic, ki smo jih uporabili v našem projektu, smo dobili od podjetja Animacel d.o.o. Uporabili smo celice 20 živali, 10 samcev in 10 samic. Za vsako žival smo napravili po tri ponovitve v triplikatu.

### *Gojenje mezenhimskih matičnih celic in celic HEK-293 in vitro*

Pri delu smo uporabljali humane embrionalne ledvične celice (HEK-293) (Evropska kolekcija živalskih celičnih kultur – European Collection of Animal Cell Cultures), ki so trajna linija primarnih ledvičnih celic, transformiranih z DNA humanega adenovirusa tipa 5 (5). Celice HEK-293 smo rutinsko vzdrževali v Eaglovem mediju, modificiranem po Dulbeccu (DMEM), z 1g/L glukoze, ki smo mu dodali 10% plodovega seruma goveda (FBS), 100 I.E./ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina, mezenhimske matične celice pa v mediju DMEM, z 4,5 g/L glukoze, ki smo mu dodali 10% FBS, 100 I.E./ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina, 1% MEM NEAA (MEM neesencialnih aminokislin) in 1% MEM natrijevega piruvata. Matične celice in celice HEK-293 smo vzdrževali pri nadzorovani temperaturi 37 °C in navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5% CO<sub>2</sub>. Celice smo dnevno opazovali pod mikroskopom; ocenili smo gostoto celic v steklenici ter preverili ali ni prišlo do mikrobne okužbe ali okužbe s plesnijo. Hranilni medij smo menjavali v 3– do 4–dnevnih presledkih oz. takrat, ko so celice dosegle 90 do 100% gostoto. Celice smo subkultivirali tako, da smo jih najprej dvakrat sprali z Dulbeccovo fiziološko raztopino v fosfatnem pufru (DPBS), nato smo jih odstranili s podlage z raztopino tripsin/EDTA. Celicam v suspenziji (odlepljenim s podlage) smo nato dodali kompletni medij (FBS inhibira delovanje tripsina) z dodatkom 1 ali 4,5 g/L glukoze, jih razbili s pipetiranjem in ustrezno količino vrnili v steklenico. Preostanek celic smo uporabili za poskuse ali pa zamrznili v alikvotih po 1 ml, v kompletnem mediju z dodatkom 8% dimetilsulfoksida (DMSO) pri –80 °C. Vsi mediji in reagenti za gojenje celic so bili od proizvajalcev Sigma-Aldrich ali GibcoBRL, če ni navedeno drugače. Plastični potrošni material za gojenje in manipulacijo celic je od proizvajalca Costar (6).

### *Predhodna transfekcija z Lipofectaminom 3000<sup>®</sup> reagentom*

Predhodno transfekcijo smo izvedli na mezenhimskih matičnih celicah ter celicah HEK-293 z Lipofectaminom 3000<sup>®</sup> (Invitrogen Co.) po navodilih proizvajalca. Celice HEK-293 smo

uporabili kot kontrolo, saj je v njih znotrajcelično sporočanje preko IR poznano. Dan pred transfekcijo smo  $1 \times 10^6$  celic prenesli v petrijevke premera 60 mm, jim dodali kompletni medij DMEM ter jih inkubirali pri standardnih pogojih. Ko so celice dosegle vsaj 90% gostoto, smo izvedli transfekcijo. Skupno količino cDNA 5,5  $\mu$ g IR v vektorju pcDNA3.1(+), označenega z RLuc8 (IR-RLuc8) ter  $\beta$ -arestina 2 v vektorju pcDNA3.1(+), označenega z GFP<sup>2</sup> (GFP<sup>2</sup>/ $\beta$ -arr2) v razmerju 1:3 smo prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf), v katero smo dodali 250  $\mu$ L hranilnega medija za transfekcijo Optimem ter dodali 11  $\mu$ L Reagenta 3000. V drugo 1,5 ml epruveto smo dodali 250  $\mu$ L medija Optimem in 8,25  $\mu$ L Lipofectamina ter inkubirali 5 min. V naslednjem koraku smo združili raztopini iz obeh epruvet in nastalo mešanico inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Po končni inkubaciji smo mešanico prenesli na celice, s katerih smo odstranili kompletni medij in jim dodali 4,5 ml novega svežega medija.

### *Metoda BRET<sup>2</sup>*

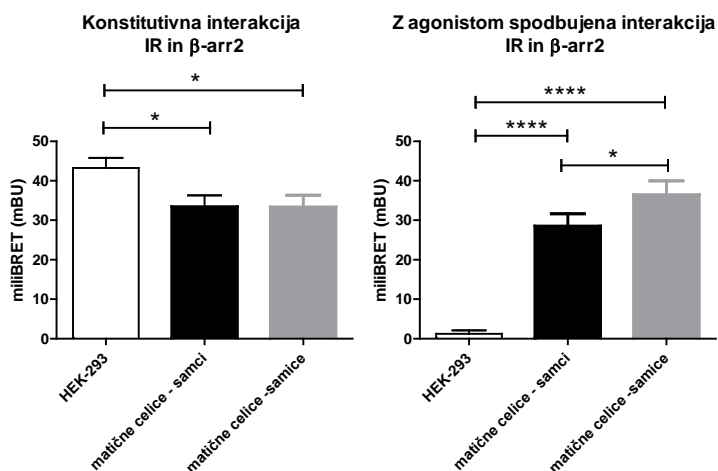
Celice smo 48 ur po transfekciji odlepili od podlage z raztopino tripsin/EDTA, sprali z DPBS, centrifugirali 5 min pri 1000 vrtljajev/min, previdno odstranili supernatant in celični pelet resuspendirali v DPBS, obogatenim s piruvatom in glukozo v gostoti  $1 \times 10^6$  celic/ml. 180 ml resuspendiranih celic smo prenesli na ploščo s 96 jamicami (white 96 well Opti Plate; PerkinElmer) in celice pri sobni temperaturi tretirali z 10  $\mu$ L agonista inzulina S100 (rekombinantni humani inzulin S100; Novo Nordisk A/S). Substrat Coelentrazin 400A (Santa Cruz Biotechnology) smo dodali z avtomatskim injektorjem do končne koncentracije 5  $\mu$ M. Signal smo izmerili sekvenčno na dveh valovnih dolžinah, 410 nm in 515 nm, izračunali razmerje 515/410 ter vrednost preračunali v enote miliBRET (mBU) (BRET $\times$ 1000) (7,8).

### *Statistična analiza*

Pridobljene rezultate smo analizirali in statistično obdelali v programu GraphPad Prism 5.0. Za ugotavljanje razlik med kontrolnimi in matičnimi celicami pri obeh spolih ter med spoloma smo uporabili neparni Studentov t-test z dvorepo porazdelitvijo. Statistične razlike smo prikazali na grafih z različnim številom zvezdic, ki kažejo na statistično značilnost rezultatov, in sicer: \* = p vrednost < 0,01; \*\* = p vrednost < 0,001, \*\*\* = p vrednost < 0,002 in \*\*\*\* = p vrednost < 0,0001.

## **Rezultati**

Prikazani rezultati kažejo na razlike v konstitutivni in z agonistom inzulinom S100 spodbujeni interakciji med IR in  $\beta$ -arr2 v matičnih celicah samcev in samic psov. Dobljeni rezultati kontrolnih celic HEK-293 so primerljivi s podatki v literaturi (9), kjer je bila interakcija med IR in  $\beta$ -arr2 že dokazana. V primerjavi z celicami HEK-293 so bile pri matičnih celicah samcev in samic opazne primerljive značilne razlike v konstitutivni interakciji IR z  $\beta$ -arr2. Pri samicah je vidna značilna razlika po stimulaciji IR z agonistom na interakcijo z  $\beta$ -arr2 v primerjavi s samci. Interakcija pri matičnih celicah samcev in samic se značilno povišana v primerjavi s kontrolnimi HEK-293 celicami (Grafikon 1). Za potrditev vpliva te interakcije na znotrajcelično signalizacijo želimo v nadaljevanju izvesti dodatne poskuse testa aktivacije sekundarnega sporočilnega sistema, s katerimi bi potrdili ali izključili direktne, od agonista odvisne proteinsko-proteinske interakcije med IR in  $\beta$ -arr.



Grafikon 1: Signal BRET<sup>2</sup> po aktivaciji inzulinskega receptorja v matičnih celicah samcev in samic psov v primerjavi s kontrolnimi celicami HEK-293. Prikazane so razlike med konstitutivno interakcijo ter z agonistom spodbujeno interakcijo med IR in  $\beta$ -arr2 med kontrolnimi celicami HEK-293 ter v matičnih celicah samcev in samic psov. Prikazane so vrednosti reprezentativnih poskusov, ki so bili ponovljeni trikrat, meritve so bile opravljene v treh ponovitvah. \*Razlika je statistično značilna pri \* = p vrednost < 0,01; \*\* = p vrednost < 0,001, \*\*\* = p vrednost < 0,002 in \*\*\*\* = p vrednost < 0,0001

## Razprava

Rezultati prikazujejo razliko v interakciji med IR in  $\beta$ -arr2 v kontrolni celični liniji HEK-293 in v matičnih celicah pridobljenih iz maščobnega tkiva samcev in samic psov brez dodatka agonista (konstitutivna interakcija) in z dodatkom agonista inzulina. Dodatek agonista inzulina je v celicah povzročil značilno višjo interakcijo med  $\beta$ -arr2 ter IR med kontrolnimi celicami HEK-293 ter matičnimi celicami maščobnega tkiva samcev in samic, kar vpliva na prenos signala v celico. Pri samicah je bila z agonistom spodbujena interakcija IR in  $\beta$ -arr2 višja kot pri samcih, kar kaže na razlike med spoloma.  $\beta$ - arestini so bistvene urejevalne molekule za diferenciacijo maščobnih celic, saj imajo vlogo pri prenosu znotrajceličnega signala ter razvoju in napredovanju adipogeneze (10).

Prikazane razlike lahko delno pojasnijo razlike v odzivnosti na inzulin v organizmu, saj interakcija  $\beta$ -arestina z IR uravnava občutljivost organizma na inzulin in posledično vpliva na razvoj debelosti in sladkorne bolezni tipa 2 (11). Rezultati sovpadajo z dosedanjimi odkritji, ki potrjujejo razlike v znotrajceličnem sporočanju med spoloma. Tako na primer razlike v znotrajceličnem sporočanju kortikotropinskega receptorja (CRF-1) vodijo v različen odziv organizma na stres pri moških in ženskah. V literaturi najdemo razlike med spoloma še pri receptorju GPR30, za katerega je značilna različna lokalizacija receptorja v celici med spoloma v srčnih mišičnih celicah, kar ima pomembno vlogo pri kardiovaskularnih obolenjih (12). Za receptor siroto GPR50, ki prav tako spada v superdružino GPCR, so pokazali spolni dimorfizem v smislu njegove vloge pri dovzetnosti za nastanek bipolarnih motenj (13). Za receptor za melanokortin tip 4 (MC4R), ki je pomembna tarča za zdravljenje metabolnih motenj, je prav tako značilen spolni dimorfizem (14). Dodatno razumevanje spolnega dimorfizma, ki je lahko vzrok različnemu poteku bolezni, nam omogoča identifikacijo ustreznih tarč za zdravljenje in v prihodnosti individualizacijo ter optimizacijo zdravljenja glede na spol osebnika, kar bi za paciente pomenilo manj neželenih učinkov in hitrejšo ozdravitev (15).

## Reference

1. O matičnih celicah. (31.08.2014) Dostopno na: <http://www.animacel.com/sl/o-maticnih-celicah>.
2. Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. Stem cell: Past, Present and future- A review article. IJMU 2008;3:22-30.

3. Drinovec L, Kubale V, Larsen JL, Vrecl M. Mathematical models for quantitative assessment of bioluminescence resonance energy transfer: application to seven transmembrane receptors oligomerization. *Front Endocrinol* 2012; 3:1-10.
4. Kubale V, Vrecl M. Novi postopki za ugotavljanje proteinsko-proteinskih interakcij v živih celicah. *Vet Nov* 2004; 30: 271-8.
5. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
6. Blagotinšek K. Funkcionalni pomen območja v tretji znotrajcelični zanki za specifičnost delovanja dolge oblike dopaminskega receptorja tipa 2 ( $D_{2L}$ -R). Ljubljana, 2012: 18-25.
7. Xu Y, Kanauchi A, von Arnim AG, Piston DW, Johnson CH. Bioluminescence resonance energy transfer: monitoring protein-protein interactions in living cells. *Methods Enzymol* 2003; 360: 289-301.
8. Vrecl M. The use of BRET of study receptor protein interaction. *Frontiers in endocrinology*. (Online) 2014, 2, [http://www.frontiersin.org/books/The\\_use\\_of\\_BRET\\_to\\_study\\_receptor-protein\\_interactions/269](http://www.frontiersin.org/books/The_use_of_BRET_to_study_receptor-protein_interactions/269) (dostopno 31.8.2014).
9. Mandic M, Drinovec L, Glisic S, Veljkovic N, Nøhr J, Vrecl M. Demonstration of a Direct Interaction between  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor and Insulin Receptor by BRET and Bioinformatics. *PLoS One*. 2014; 9(11): 1-15.
10. Santos-Zas I, Lodeiro M, Gurriarán-Rodríguez U, Bouzo-Lorenzo M, Mosteiro CS, Casanueva FF, Casabiell X, Pazos Y, Camiña JP.  $\beta$ -Arrestin signal complex plays a critical role in adipose differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 5:1281-92.
11. Feng X, Wang W, Liu J, Liu Y.  $\beta$ -Arrestins: multifunctional signaling adaptors in type 2 diabetes. *Mol Biol Rep* (2011) 38:2517-2528.
12. Lenhart PM, Broselid S, Barrick CJ, Leeb-Lundberg LM, Caron KM. G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. *J Mol Endocrinol*. 2013; 51(1):191-202.
13. Thomson PA, Wray NR, Thomson AM, Dunbar DR, Grassie MA, Condie A, Walker MT, Smith DJ, Pulford DJ, Muir W, Blackwood DH, Porteous DJ. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry*. 2005; 10:470-8.
14. Lensing CJ, Haskell-Luevano C. Ac-Trp-DPhe(p-I)-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>, a 250-Fold Selective Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Antagonist over the Melanocortin-3 Receptor (MC3R), Affects Energy Homeostasis in Male and Female Mice Differently. *ACS Chem Neurosci*. 2016 Jul 22. (Epub ahead of print)
15. Valentino RJ, Van Bockstaele E, Bangasser D. Sex-specific cell signaling: the corticotropin-releasing factor receptor model. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 437-44.

## **Sex specific intracellular signaling of the female and male dog stem cells after insulin receptor activation with the use of BRET<sup>2</sup> method**

Veterinary faculty in Ljubljana was among the first to use animal joint treatments in clinical practice. The European project goal was to develop new treatment methods using donor stem cells. Within the project we studied sexual dimorphism in dog's stem cells derived from adipose tissue for the potential differences in intracellular signaling after insulin receptor (IR) activation *in vitro*. To display the differences in the interaction of IR with  $\beta$ -arrestin 2 ( $\beta$ -arr2) after the activation of IR, we used the method of bioluminescence

---

resonance energy transfer (BRET2). The results showed that the difference after agonist stimulation is significantly higher in female stem cells. The discovery of differences in insulin receptor activation in female and male cells is important for understanding pathology of diseases such as obesity and diabetes. The understanding of sexual dimorphism could enable the development and use of gender-targeted therapy.

Key words: stem cells; BRET2; sexual dimorphism

# ALI TIMOL V RAZMERAH IN VITRO ZAVIRA KONTRAKCIJE TANKEGA ČREVEESA, POVZROČENE Z ACETILHOLINOM? PRELIMINARNA RAZISKAVA

Luka Prem<sup>1</sup>, Silvestra Kobal<sup>1</sup>, Saša Trailović<sup>2</sup>, Tomaž Snoj<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija, <sup>2</sup>Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

tomaz.snoj@vf.uni-lj.si

Timol (5-metil-2-izopropilfenol) je derivat fenola, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus spp.*) in nekaterih drugih rastlin. V literaturi je poleg številnih drugih učinkov opisano tudi njegovo spazmolitično delovanje. Namen naše preliminarnе raziskave je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa, ki jih povzroča acetilholin. Za delo smo uporabili izolirani ileum dveh podgan pasme Wistar, meritve intenzivnosti kontrakcij ileuma pa smo izvedli s sistemom za delo z izoliranimi organi. Kontraksije ileuma smo povzročili z dodajanjem različnih odmerkov acetilholina in timola v kiveto v neposredno bližino izoliranega ileuma. Rezultati kažejo, da timol znatno zmanjša intenzivnost kontrakcij ileuma, povzročenih z acetilholinom. Za ugotovitev natančnega mehanizma delovanja timola in možnost uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim delovanjem bodo potrebne nadaljnje raziskave.

Ključne besede: timol; acetilholin; kontrakcije; ileum

## Uvod

Timol (5-metil-2-izopropilfenol) je monoterpenski derivat fenola, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus spp.*) in nekaterih drugih rastlin. Terpeni so obsežna skupina naravnih hidrokarbonov. Prisotni so v višjih rastlinah kot produkt njihovega metabolizma in so sestavni del eteričnih olj. Zdravilni učinki ekstraktov timijana so najverjetneje povezani prav z delovanjem timola. V literaturi se nahajajo podatki, da timol poleg številnih drugih učinkov deluje tudi protibakterijsko, protiglivično, protiparazitarno, protivnetno in spazmolitično (1, 2). Kot akaricid se uporablja za zdravljenje varoze pri čebelah. Učinek timola na motoriko črevesa in mehanizem njegovega delovanja nista dobro poznana, pomembna pa sta s stališča morebitne uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim in relaksantnim delovanjem ali kot zdravila za odpravljanje želodčno-črevesnih zajedavcev.

Kontraksijo gladkih mišičnih celic povzročajo številni endogeni mediatorji, kot so acetilholin (ACh), serotonin, histamin ter nekatere snovi zunanjega izvora. ACh kot neurotransmiter parasimpatičnega živčnega sistema povzroči kontrakcijo gladkih mišičnih celic prebavil z vezavo na z G-proteinom sklopljena muskarinska receptorja M2 in M3 (3). Pri tem kot drugi glasnik nastane inositoltrifosfat (IP3), ki povzroči odpiranje kalcijevih kanalčkov in vstop kalcija v celico, kar posledično privede do aktivacije kontraktilnih proteinov in kontrakcij gladkih mišičnih celic (4). Nekatere snovi zunanjega izvora vplivajo na intenzivnost kontrakcij gladkih mišičnih celic s tem, da z vezavo na muskarinske M2 in M3 receptorje onemogočajo vezavo endogenih mediatorjev ter na ta način delujejo kot

antagonisti, ali zaradi interakcije z membranskimi kalcijevimi kanalčki zavirajo vstop kalcija v celico. Namen našega dela je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa, ki jih povzroča ACh.

## Material in metode

Poskus je potekal na izoliranemu ileumu dveh podgan pasme wistar, starih štiri mesece. Pred odvzemom omenjenega organa smo podgani evtanazirali s ogljikovim dioksidom in ju izkrcavali. Takoj po evtanaziji smo s škarjami odprli trebušno steno, odvzeli približno 2 cm dolg odsek ileuma in ga preprali s Tyrodejevo raztopino (5). Izolirani del ileuma smo namestili v sistem za delo z izoliranimi organi (Elunit, Srbija). Registracijo kontrakcij smo izvedli z izometričnim pretvornikom, rezultate pa prikazali s pomočjo programske opreme eLabs (Elunit, Srbija). Izolirano črevo je bilo nameščeno v kiveti s kapaciteto 20 ml. Razmere *in vitro* so bile sledeče: Tyrodejeva raztopina, 37°C, ventiliranje z mešanico plinov (95% O<sub>2</sub> in 5% CO<sub>2</sub>). Poskus smo izvedli z dodajanjem ACh in timola v kiveto v neposredno bližino izoliranega ileuma po sledečem protokolu: 1.) različni odmerki ACh in registracija intenzivnosti kontrakcije tankega črevesa; 2.) dodatek timola in enakih odmerkov ACh kot v točki 1 ter registracija intenzivnosti kontrakcij ileuma; 3.) ponovitev postopka iz točke 1.

Potek poskusa prikazuje Tabela 1.

## Rezultati

Kontrakcije enega od dveh uporabljenih ileumov, ki so bile povzročene z ACh ob odsotnosti in prisotnosti timola, so prikazane na Sliki 1.

Tabela 1: Potek poskusa z acetilholinom in timolom pri ugotavljanju intenzivnosti kontrakcij ileuma v razmerah *in vitro*

*Prikazane so koncentracije acetilholina, ki smo jo uporabili za povzročanje kontrakcij. Med posameznimi odmerki smo črevo dvakrat sprali s Tyrodejevo raztopino. Pri ugotavljanju delovanja timola smo timol uporabljali v koncentraciji 0,03 mg/ml.*

	ACh 1 (3 x 10 <sup>-6</sup> mg/ml)	ACh 2 (1 x 10 <sup>-5</sup> mg/ml)	ACh 3 (3 x 10 <sup>-5</sup> mg/ml)	ACh 4 (1 x 10 <sup>-4</sup> mg/ml)	ACh 5 (3 x 10 <sup>-4</sup> mg/ml)	ACh 6 (1 x 10 <sup>-3</sup> mg/ml)	ACh 7 (3 x 10 <sup>-3</sup> mg/ml)
1. kontrola	ACh 1	ACh 2	ACh 3	ACh 4	ACh 5	ACh 6	ACh 7
1. delovanje timola	T + ACh 1	T + ACh 2	T + ACh 3	T + ACh 4	T + ACh 5	T + ACh 6	T + ACh 7
1. kontrola	ACh 1	ACh 2	ACh 3	ACh 4	ACh 5	ACh 6	ACh 7

## Razprava

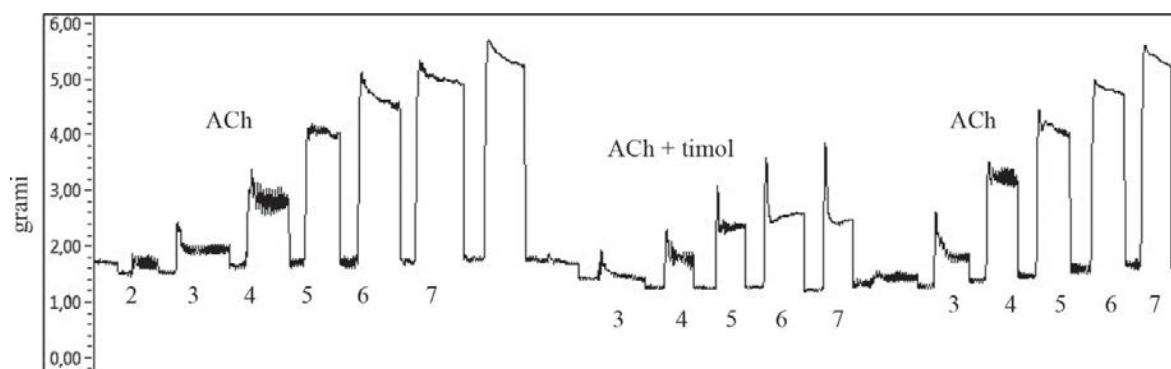
Preliminarna raziskava o vplivu timola na intenzivnost kontrakcij ileuma, povzročenih z ACh, kaže, da so enaki odmerki ACh ob prisotnosti timola povzročili znatno šibkejšo kontrakcije, kot smo jih izmerili, če timola nismo uporabili. Naše rezultate lahko primerjamo z rezultati objavljene raziskave (2), pri kateri je bil, prav tako v razmerah *in vitro*, ugotovljen spazmolitični učinek timola. Poskus smo opravili na ileumih dveh različnih podgan in v obeh primerih dobili enak odziv izoliranega organa, zaradi česar sklepamo, da je prisotnost



timola v razmerah *in vitro* predstavljal dejavnik, ki je vplival na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa. Iz te preliminarne raziskave ni razviden natančen mehanizem delovanja timola. Njegov učinek na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa bi lahko bil posledica interakcije z receptorji M2 in M3, oziroma z membranskimi kalcijevimi kanalčki kot tudi z adrenergičnimi receptorji (1, 2). Ta vprašanja so predmet nadaljnjih raziskav. Dosedanji rezultati pa kažejo na potencialno možnost uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim delovanjem. Pred dejansko uporabo timola kot zdravila je še dolga pot, saj je potrebno poleg določitve natančnega mehanizma delovanja izvesti tudi klinično preizkušanje na laboratorijskih in ciljnih živalskih vrstah ter ugotoviti njegove morebitne stranske, neželene in toksične učinke na organizem.

## Reference

1. Nagle PS, Pawar YA, Sonawane AE, et al. Thymol: synthesis, reactions & its spectrum of pharmacological and chemical applications. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 3: 7549-61.
2. Beer AM, Lukanov J, Sagorchev P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 2007; 14: 65-9.
3. Abraham G. The importance of muscarinic receptors in domestic animal diseases and therapy: Current and future perspectives. *The Veterinary Journal* 2016; 208: 13-21.
4. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* 2003; 27: 201-6.
5. Kobal S, Skubic V. *Praktikum iz farmakodinamike in farmakokinetike*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, 1987.



Koncentracija ACh:

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1: $3 \times 10^{-6}$ mg/ml | 5: $3 \times 10^{-4}$ mg/ml |
| 2: $1 \times 10^{-5}$ mg/ml | 6: $1 \times 10^{-3}$ mg/ml |
| 3: $3 \times 10^{-5}$ mg/ml | 7: $3 \times 10^{-3}$ mg/ml |
| 4: $1 \times 10^{-4}$ mg/ml |                             |

Koncentracija timola: 0,03 mg/ml

Slika 1: Prikaz intenzivnosti kontrakcij ileuma v odvisnosti od koncentracije ACh (mg/ml) in vpliv timola na kontrakcije izzvane z ACh (izpis iz eLabs)

## **Does thymol under *in vitro* conditions act as a suppressor of small intestine contractions caused by acetylcholine? Preliminary study**

Thymol (5-methyl-2-isopropylphenol) is a phenol derivate which is found in essential oil of thyme (*Thymus spp.*) and some other plants. Beside several other effects spasmolytic activity of thymol was described. Therefore, the aim of our preliminary study was to determine the impact of thymol on the intensity of small intestine contractions caused by acetylcholine under *in vitro* conditions. In this study ileums of two Wistar rats were used and the intensity of ileum contraction was measured with the system for work on isolated organs. Different amounts of acetylcholine and thymol were added into the chamber with isolated ileum to exhibit ileum contractions. Results show that thymol suppresses intensity of ileum contractions caused by acetylcholine. In order to determine the exact mechanism of thymol action and to estimate the possible use of thymol as a drug with spasmolytic activity further studies should be performed.

Key words: thymol; acetylcholine; contractions; ileum

# DOLOČITEV PRVEGA CELOTNEGA GENOMA VIRUSA BOVINE VIRUSNE DIAREJE V SLOVENIJI

Ivan Toplak\*, Darja Kušar, Bojan Papić, Urška Kuhar

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Okužbe z virusi bovine virusne diareje (BVD) spremljamo v Sloveniji od leta 1994 naprej. V predhodnih raziskavah smo med leti 1997 in 2004 z genotipizacijo 5'-nekodirajoče regije virusov BVD v okuženih rejah ugotovili kroženje štirih podtipov virusov BVD (1b, 1d, 1f, 1g). Leta 2006 smo v skupini uvoženih govedu v karantenskem hlevu dokazali akutno okužbo z virusom BVD in z genotipizacijo prvič ugotovili prisotnost virusa BVD podtipa 1e. Virus BVD smo iz seruma obolelih živali izolirali na celični kulturi. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) Ion Torrent smo določili celotni genom izolata BVD SLO2407/2006 dolžine 12.258 nukleotidov (nt). Primerjava zaporedja celotnega genoma z zaporedji virusov BVD v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah je pokazala le 85% identičnost v nukleotidnem zaporedju z najbližjim izolatom BVD "Carlito" iz Švice. Virusni izolat BVD SLO2407/2006 ima značilno organizacijo genoma BVD s 5'-nekodirajočo regijo dolžine 376 nt, sledi regija, ki kodira enotni poliprotein v dolžini 3.899 aminokislin in 3'-nekodirajoča regija dolžine 184 nt. To je prvi virus BVD, ki smo mu v Sloveniji določili zaporedje celotnega genoma.

**Ključne besede:** Virus bovine virusne diareje; sekvenciranje Ion Torrent; sekvenciranje celotnega genoma; govedo

## Uvod

V Sloveniji spremljamo okužbe z virusi bovine virusne diareje (BVD) pri govedu od leta 1994 naprej (1). Bolezen je v Sloveniji endemična, z virusom pa je okužena približno ena tretjina govejih čred. Med leti 1997 in 2004 smo z genotipizacijo 5'-nekodirajoče regije virusov BVD v okuženih rejah ugotavljali kroženje štirih podtipov BVD (1b, 1d, 1f, 1g). Virusi BVD se med slovenskimi rejami pogosto prenašajo (2). Zaradi velikih ekonomskih škod, ki jih okužba z virusi BVD v rejah povzroča, so se številne evropske države odločile za izkoreninjenje bolezni in tudi dosegle status države proste BVD. Tako so zmanjšale ekonomske škode in možnost novih okužb. Vnos virusa BVD v neokužene reje je mogoče preprečiti tudi z izvajanjem preventivnih ukrepov, občasno pa se novi sevi virusov vnesejo v naše reje z uvozom okuženih in nepregledanih živali (3).

Do nedavnega smo za genetsko tipizacijo sevov virusov BVD uporabljali klasično sekvenciranje po Sangerju in s primerjavo kratkih odsekov virusnega genoma uvrstili posamezni izolat v ustrezen podtip. Nova tehnologija sekvenciranja naslednje generacije (NGS) omogoča ugotavljanje različnih patogenov v vseh vrstah vzorcev. Določitev celotnega genoma posameznega patogena ne podaja le več informacij o samem patogenu, ampak omogoča tudi natančnejše filogenetske primerjave s sevi iz celega sveta. Za tovrstne raziskave so še posebej zanimivi sevi, ki se razlikujejo od zaporedij, objavljenih v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah. Namen raziskave je bil določitev celotnega genoma iz arhivskega izolata virusa BVD, izoliranega na celični kulturi.

## Material in metode

Leta 2006 so iz Francije v Slovenijo uvozili skupino 28 goved. V karantenskem hlevu je rejec v prvem tednu pri večini živali opazil klinično sliko pljučnice in driske ter posumil na okužbo z virusom BVD. Vsem živalim smo odvzeli vzorce seruma in jih preiskali z metodo RT-PCR ter pozitivne vzorce virusa tipizirali z določitvijo kratkega odseka v 5'-nekodirajoči regiji s sekvenciranjem po Sangerju (2). Iz pozitivnih vzorcev smo uspešno izvedli izolacijo virusa BVD na primarni celični kulturi turbinalnih nosnih školjk (2). Iz namnoženega izolata BVD smo celokupno nukleinsko kislino izolirali s kompletom QIAamp Viral RNA (Qiagen, Nemčija) in za določitev celotnega genoma virusa BVD uporabili metodo NGS Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Najpodobnejša nukleotidna zaporedja v podatkovni zbirki NCBI GenBank smo poiskali z algoritmom BLAST. Za analizo celotnega genoma smo uporabili program DNASTAR Lasergene.

## Rezultati

V karantenskem hlevu smo pri 17 živalih (60,71%) z metodo RT-PCR dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa BVD. Virus BVD SLO2407/2006 smo iz seruma obolelih živali izolirali na celični kulturi in ga do nadaljnjih preiskav hranili v arhivski zbirki. Filogenetska analiza zaporedja 5'-nekodirajoče regije, dolžine 243 nt, je pokazala, da se izolat uvršča med viruse BVD podtip 1e. Z metodo NGS smo uspešno določili zaporedje celotnega genoma virusa BVD, ki je dolgo 12.258 nt. Genom smo sestavili iz 1.823 pridobljenih odčitkov s povprečno dolžino 121 nt. Povprečna pokritost genoma je bila 18-kratna. Izolat BVD SLO2407/2006 ima značilno organizacijo genoma virusa BVD s (i) 5'-nekodirajočo regijo (376 nt), sledi (ii) regija, ki kodira enotni poliprotein v dolžini 3.899 aminokislin (kodirajoča regija v genomu obsega 11.697 nukleotidov, med pozicijama 377 in 12.074), in (iii) 3'-nekodirajoča regija (184 nt). Primerjava zaporedja celotnega genoma s sevi virusa BVD v podatkovni zbirki NCBI GenBank je pokazala le 85% identičnost v nukleotidnem zaporedju z njemu najbližjim izolatom BVD "Carlito" (KP313732), ki so mu celotni genom določili leta 2014 v Švici (4).

## Razprava

Znotraj Slovenije se okužbe z virusom BVD najpogosteje širijo z nakupom nepregledanih živali. Občasno se v državo vnese tudi kakšen nov sev BVD, največkrat z nakupom nepregledanega goveda. V letu 2006 smo v karanteni 28 živali ugotovili prisotnost akutne okužbe z virusom BVD pri 17 živalih in prvič v Sloveniji ugotovili prisotnost novega podtipa virusa BVD 1e. Čeprav naj bi bile vse živali iz karantene po ugotovitvi virusa neškodljivo odstranjene, smo isti sev virusa BVD 1e ugotovili še v dveh rejah, leta 2014. Določitev prvega celotnega genoma virusa BVD v Sloveniji je pomembna iz več razlogov. Določili smo celotni genom popolnoma novega seva virusa BVD, ki se precej razlikuje od genomov virusov BVD v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah. To potrjuje, da z metodo NGS lahko uspešno določimo kateri koli virusni genom brez predhodnega poznavanja njegovega nukleotidnega zaporedja. Izolat virusa BVD, ki ga hranimo v naši zbirki, predstavlja dodano vrednost k raziskavi, saj je do sedaj le malo objavljenih sevov s podobnim genomom. Najbolj podoben genom ima švicarski sev BVD "Carlito", ki se v celotnem nukleotidnem zaporedju razlikuje za 15%. Razlike, ki smo jih ugotovili, so enakomerno razporejene po celotnem genomu. Uspešno smo uporabili novo tehnologijo Ion Torrent, ki omogoča visoko zmogljivo

sekvenciranje celotnih genomov. Pridobljene izkušnje z NGS bomo lahko v prihodnje uporabili tudi pri diagnostiki in raziskovanju drugih virusov. Virus BVD SLO2407/2006 je prvi sev BVD v Sloveniji, ki smo mu uspeli določiti zaporedje celotnega virusnega genoma.

## Reference

1. Grom J, Barlič-Maganja. Bovine viral diarrhoea (BVD) infections - control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol* 1999; 2: 259-264.
2. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih ple-menskih rejah govedi: doktorska disertacija. 2004.
3. Toplak I, Hostnik P, Rihtarič D, Grom J. The voluntary programme for control and eradication of bovine viral diarrhoea virus infection in Slovenia. *First International Symposium of Veterinary Medicine - ISVM 2015*. Novi Sad: 2015: 36-41.
4. Stalder H, Schweizer M, Bachofen C. Complete genome sequence of bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1e strain isolated in Switzerland. *Genome Announc* 2015; 3: e00636-15.

## Determination of first complete genome of bovine viral diarrhoea virus in Slovenia

In Slovenia, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections have been monitored since 1994. In our previous studies that included genotyping of the 5'-noncoding region of BVDV, it was discovered that four subtypes of BVDV (1b, 1d, 1f, 1g) were circulating in the infected cattle farms between 1997 and 2004. In 2006, an acute infection with BVDV was confirmed in a group of imported cattle under quarantine and genotyping revealed for the first time the presence of BVDV subtype 1e. BVDV was successfully isolated in cell culture from serum of diseased animals. Using the next generation sequencing (NGS) Ion Torrent technology, a complete genome of the BVDV isolate SLO2407/2006 comprising 12.258 nucleotides (nt) was determined. Comparison of the complete BVDV genome with other BVDV sequences in public databases revealed only 85% nucleotide identity with the closest isolate BVD "Carlito" from Switzerland. BVDV isolate SLO2407/2006 shows a typical BVDV genome organization, with a 5'-noncoding region of 376 nt, followed by a coding region for a single polyprotein with 3.899 amino acids and a 3'-noncoding region of 184 nt. This is the first report of a Slovenian BVDV isolate for which a complete genome sequence was determined.

Key words: Bovine viral diarrhoea virus; Ion Torrent sequencing; complete genome sequencing; cattle

# KARAKTERIZACIJA MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIC HEK-293 TRANSFECIRANIH Z MUTANTNIMI OBLIKAMI RECEPTORJA ZA GRELIN (GHS-R1a) Z OSLABLJENO SPOSOBNOSTJO VEZAVE LIGANDA ALI AKTIVACIJO SEKUNDARNEGA SPOROČILNEGA SISTEMA

Špela Vidrih, Valentina Kubale Dvojmoč\*

Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

valentina.kubaledvojmoč@vf.uni-lj.si

Eden izmed tarčnih kandidatov za razvoj zdravila, ki bi vplivalo na zmanjšanje apetita je sedemtransmembranski receptor (7TM-R) za grelin (GHS-R1a). V raziskavi smo proučili vpliv posameznih aminokislinskih ostankov v tretjem in šestem transmembranskem območju receptorja, ki imajo vpliv na aktivacijo sekundarnega sporočilnega sistema v celici ali pa na sposobnost vezave liganda. Ugotavljali smo vpliv spremenjenih lastnosti receptorjev na obliko, velikost celic, razporeditev ter prerazporeditev citoskeleta ter vlogo posameznih G-proteinov pri preoblikovanju citoskeleta. Uporabili smo divjo in mutantne oblike GHS-R1a, ki smo jih kotransfecirali z dominantno negativnimi oblikami G-proteinov, ter prikazali s pomočjo konfokalne mikroskopije. Ugotovili smo, da imajo podenote  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  vlogo v prerazporeditvi aktinskega citoskeleta in mikrotubulov. Pri mutantni obliki GHS-R1a s povečano konstitutivno aktivnostjo je bila vloga obeh G-proteinov izrazitejša. Pri mutantni obliki receptorja s spremembo v ohranjenem motivu DRY smo opazili razlike pri polimerizaciji mikrotubulov. Pri celicah z soizraženimi mutantami GHS-R1a z okvarjeno funkcijo vezave liganda ali funkcijo prenosa signala v celico smo opazili podobno morfolgijo celic, razporeditev mikrotubulov ter aktinskega citoskeleta kot pri celicah z izraženo divjo obliko receptorja.

Ključne besede: receptor za grelin; mutageneza; regulacija apetita; celice HEK-293

## Uvod

Epidemična razsežnost debelosti je postala izhodišče za zanimanje farmacevtske industrije za razvoj zdravila, ki bi vplivalo na zmanjšanje apetita. Hormonski sistem in mehanizmi, ki urejajo vnos energije vključujejo hormon grelin ter receptor za grelin (GHS-R1a) so zelo kompleksni in jih je potrebno podrobneje proučiti. GHS-R1a uvrščamo v razred A superdružine sedem transmembranskih (TM) receptorjev. Peptidni hormon grelin se veže na receptor in sproži znotrajcelični prenos signala večinoma preko  $G\alpha_{q/11}$  podenote proteina G, kar se kaže v akumulaciji inositol fosfata in sproščanju kalcija. Grelin poveča izločanje rastnega hormona iz hipofize in s tem pomembno vpliva na kratkoročno in dolgoročno uravnavanje telesne teže (1,2). Pomembna je tudi njegova visoka konstitutivna aktivnost. Članom skupine A je skupnih več ohranjenih zaporedij, kot so cisteinski aminokislinski ostanki na vrhu TM-III in 2. zunajcelične zanke, ki tvorijo disulfidni mostiček,

ki zanko razdeli v dva dela, prolini v TM-V (ProV:16 oz. V:50), TM-VI (ProVI:15 oz. VI:50, ProVII:17 oz. VII:50), motiv E/DRY na meji TM-III in 2. znotrajcelično zanko, polarni TM aminokislinski ostanki na več mestih v receptorju in več potencialnih mest za post-translacijske modifikacije kot so npr. možna glikozilacijska mesta v N-terminalnem koncu receptorja. Za GHS-R1a so poleg zgoraj naštetih ohranjenih mest pomembni še motiv NPXXY na koncu TM-VII, ki ima pomembno vlogo pri aktivaciji receptorja, interakciji s proteini G ter internalizaciji. Za aktivacijo so pomembna tudi t.i. mikrostikala v TM:III (ArgIII:26) (3, 4). V študiji smo testirali več mutantnih oblik grelinskega receptorja in sicer GluIII:09Gln (R141A), pri kateri je bil bazični arginin v motivu DRY zamenjan z nepolarnim alaninom, kar se je kazalo v zmanjšanem prenosu signala v celico, GluIII:09Gln (E124Q), pri katerem je zamenjana kislina glutaminska kislina z nenabitim polarnim glutaminom zmanjšala zmožnost prenosa znotrajceličnega signala preko GHS-R1a ter TrpVI:13Ala (W276A), kjer je prišlo do zamenjave triptofana, ki ima aromatično stransko verigo z nepolarno metilno stransko verigo v alanin, kar povzroči zmanjšan prenos signala. Zanimal nas je celični odziv pri konstitutivno aktivnem receptorju GHS-R1a na organizacijo aktinskega citoskeleta in mikrotubulov v celici, vpliv aktivacije GHS-R1a na citoskelet ter vpliv mutantnih oblik receptorja, ki imajo okvarjeno funkcijo vezave liganda ali prenos signala v celico, na razporeditev in prerazporeditev citoskeleta v celici. Proučevali smo tudi vlogo podenot  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  pri preoblikovanju citoskeleta.

## Material in metode

Za naše delo smo uporabili rekombinantni plazmidni vektor pcDNA3+, divjo obliko grelinskega receptorja (WT GHS-R1a) in konstrukte mutantnih oblik grelinskega receptorja (ArgIII:26Ala, GluIII:09Gln in TrpVI:13Ala), ki smo jih okarakterizirali s predhodno opravljenim testom ELISA. Pri delu smo uporabljali trajno celično linijo primarnih humanih embrionalnih ledvičnih celic - HEK-293 (Evropska zbirka živalskih celičnih kultur - European Collection of Animal Cell Culture), ki smo jih gojili *in vitro* in nato prehodno transfecirali z DNA z različnih oblik receptorjev in proteinov G - DN mutante podenote  $\alpha$  G-proteina  $G\alpha_{12}$  (Q231L/D299N) in  $G\alpha_{13}$  pa Q226L/D294N (UMR cDNA<sup>®</sup>). Celice smo nato fiksirali, aktinske filamente smo označili z rodamin faloidinom, divjo in mutantne oblike receptorja ter mikrotubule pa smo prikazali imunohistokemijsko ter jih pripravili za konfokalno mikroskopijo, s katero smo opazovali celično lokalizacijo receptorjev in morfologijo citoskeleta. Za receptorje smo uporabili primarna podganja protitelesa proti epitopu FLAG (Sigma Aldrich) ter sekundarnima kozja protipodganja protitelesa Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), za mikrotubule pa primarna mišja protitelesa proti  $\alpha$ -tubulinu ter sekundarna kozja protimišja protitelesa Alexa 488. S pomočjo konstruktov smo proučili vpliv posameznih aminokislin v TM-III in TM-VI, ki imajo vpliv bodisi na aktivacijo sekundarnega sporočilnega sistema v celici ali pa na spodobnost vezave liganda v smislu njihove internalizacije, ravni konstitutivne aktivnosti ter vpliva na morfologijo in prerazporeditev aktinskih filamentov in mikrotubulov. Opravili smo tudi morfometrično analizo celic z računalniškim programom Image J (National Institute of Health). Izmerili smo površine celic, ki so izražale divjo ali mutantne oblike GHS-R1a.

## Rezultati

S konfokalno mikroskopijo smo opazovali lokalizacijo receptorja v celici in potrdili funkcionalnost divje in mutantnih oblik GHS-R1a. Pri mutanti ArgIII:26Ala je prišlo do

povečanja znotrajceličnega signala mutantne oblike GHSR1a, vendar brez sprememb na površini celic. Pri mutantni obliki TrpVI:13Ala je bilo opaziti več signala mutantne oblike GHSR1a na površini celic. Pri aktivaciji divje oblike in mutante receptorja GluIII:09Gln z agonistom je prišlo do prerazporeditve signala mutantne oblike GHSR1a v notranjost celice in povečanja celične površine. Izstopajoče povečanje površine celice pri GluIII:09Gln so potrdili tudi rezultati morfometrične analize celic. Povečana konstitutivna aktivnost GluIII:09Gln se je kazala tudi v izraziti prerazporeditvi aktinskega citoskeleta v celici in je imela vpliv na reorganizacijo aktinskega citoskeleta preko podenot  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$ , kar smo zavrli z dodatkom dominantno negativnih oblik proteinov G. Na formacijo mikrotubulov pa podenote  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  ter večja konstitutivna aktivnost receptorja niso imele vpliva pri divji obliki receptorja in mutanti GluIII:09Gln. Nasprotno pa je pri mutanti ArgIII:26Ala prišlo do povečane polimerizacije mikrotubulov od dodatku DN oblik podenot  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  (Tabela 1).

## Razprava

Divja oblika GHS-R1a je konstitutivno aktivna (6). Za mutantno obliko GluIII:09Gln je značilna povišana konstitutivna aktivnost, ki bi lahko bila razlog za povečano velikost celic in spremembe v aktinskem citoskeletu. Konstitutivna aktivnost ter še dodatna aktivacija z agonistom grelinom privede do aktivacije drugotne sporočilne poti v celici v največji meri preko podenote proteina  $G\alpha_q$  in posledično nastanka fosfoinozitolov in povečane koncentracije  $Ca^{2+}$  v celici (6). Glede na očitne spremembe v celični morfologiji transfeciranih celic z mutantno obliko receptorja GluIII:09Gln, smo pokazali, da podenote  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  igrajo vlogo pri prerazporeditvi aktinskega citoskeleta, predvsem nastanku stresnih filamentov, ki v manjši meri nastanejo tudi pri divji obliki receptorja. Obliki podenot  $\alpha$  G-proteinov  $G\alpha_{12}$  in  $G\alpha_{13}$  ne kažeta vpliva na nastanek mikrotubulov pri divji in mutantni obliki receptorja GHS-R1a s povišano konstitutivno aktivnostjo receptorja. Povišana polimerizacija mikrotubulov je vidna pri mutantni obliki receptorja s spremembo v motivu DRY. V celicah s soizraženima mutantama GHS-R1a – GluIII:09Gln in ArgIII:26Ala, ki imata bodisi okvarjeno funkcijo vezave liganda bodisi funkcijo prenosa signala v celico, smo opazili podobno morfologijo celic, razporeditev in prerazporeditev mikrotubulov in aktinskega citoskeleta kot pri celicah, kjer je bil izražen divji tip receptorja. To nakazuje na možnost homodimerizacije receptorja GHS-R1a. Novejše raziskave so potrdile, da je GHS-R1a sposoben dimerizacije v obliki homo- ali heterodimerov (7-12). Delovanje receptorja v obliki heterodimerov bi lahko bil vzrok za delovanje grelina pri stresno pogojenem prehranjevanju in motnjah hranjenja. Heterodimerizacija receptorja omogoča veliko natančnejše mehanizme pozitivne in negativne regulacije učinka grelina in predstavlja novo možnost terapevtske intervencije. Poleg prikazanih rezultatov smo z našo študijo odprli še mnogo novih vprašanj, ki bi se jim v prihodnosti želeli posvetiti.

## Reference

1. Kubale V. Appetite regulation and obesity: emphasis on ghrelin and ghrelin receptor. *Slo Vet Res* 2011; 48:69–81.
2. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 993–6.
3. Mokrosinski J, Frimurer TM, Sivertsen B, Schwartz TW, Holst B. Modulation of constitutive activity and signaling bias of the ghrelin receptor by conformational constraint in the second extracellular loop. *J Biol Chem* 2012; 287: 33488–502.



	aktin	mikrotubuli (MT)	aktin	mikrotubuli (MT)
WT GHS-R1a + aktin	mreža nitk v kortikalnem področju, lamelopodiji, stresni filamenti, nekaj razpršenega signala v citoplazmi	polimerizirani MT, ki tvorijo obsežne strukture na periferiji in žarkaste strukture, ki segajo v notranjost celice	dodatni stresni filamenti, izrazitejši kortikalni signal in lamelopodiji	prerazporeditev MT, bolj žarkasto razporejanje iz področja jedra celice navzven
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{12DN}$	več lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a	večje celice, več lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{13DN}$	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a
GluIII:09Gln (E124Q) + aktin	izrazitejši kortikalni signal, več stresnih filamentov, lamelopodijev, mikroskopskov, nekaj signala v citoplazmi	periferna oblika kortikalnih MT, žarkasta struktura MT v notranjosti	zelo izraziti stresni filamenti in mikroskopski	podobno kot pri GluIII:09Gln, samo da izraziteje
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{12DN}$	bolj izraziti lamelopodiji, manj izrazita stresna vlakna, nekaj signala v citoplazmi, večje celice	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost	še povečanje celice, manj lamelopodijev, manj stresnih filamentov, manj mikroskopskov	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{13DN}$	podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost	podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost
ArgIII:26Ala (R141A) + aktin	kortikalno področje, manj razpršenega signala v citoplazmi, stresni filament, lamelopodiji	obsežnejša žarkasta struktura MT v celici	podobno kot brez dodatka agonista	še obsežnejša žarkasta struktura MT v celici
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{12DN}$	kortikalno področje, malo v citoplazmi, manj lamelopodijev in stresnih filamentov	žarkasta struktura MT	podobno kot brez dodatka agonista	žarkasta struktura MT
+ aktin + mikrotubuli + G $\alpha_{13DN}$	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	žarkasta struktura MT	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	žarkasta struktura MT

	Brez dodatka agonista		Dodatek agonista grelina (10 $\mu$ m, 5 min, 37 °C)	
	receptor	aktin	receptor	aktin
WT GHS-R1a + aktin	na membrani, nekaj v notranjosti celice	mreža nitk v kortikalnem področju, lamelopodiji, stresni filamenti, nekaj razpršenega signala v citoplazmi	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	dodatni stresni filamenti, izrazitejši kortikalni signal in lamelopodiji
+ aktin + G $\alpha_{12DN}$	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	več lamelopodijev	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	večje celice, več lamelopodijev
+ aktin + G $\alpha_{13DN}$	nekaj receptorja na membrani, nekaj v notranjosti	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	prerazporeditev v citoplazmo, manj na membrani celice	manj stresnih filamentov in lamelopodijev
GlulIII:09Gln (E124Q) + aktin	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	izrazitejši kortikalni signal, več stresnih filamentov, lamelopodijev, mikroskopskov, nekaj signala v citoplazmi	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	zelo izraziti stresni filamenti in mikroskopski
+ aktin + G $\alpha_{12DN}$	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	bolj izraziti lamelopodiji, manj izrazita stresna vlakna, nekaj signala v citoplazmi, večje celice	prerazporeditev v notranjost	še povečanje celice, manj lamelopodijev, manj stresnih filamentov, manj mikroskopskov
+ aktin + G $\alpha_{13DN}$	Podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G $\alpha_{12DN}$ , vendar manj izrazito
ArgIII:26Ala (R141A) + aktin	Notranjost celice, zelo malo na površini	kortikalno področje, manj razpršenega signala v citoplazmi, stresni filamenti, lamelopodiji	še več signala v notranjosti celice	podobno kot brez dodatka agonista
+ aktin + G $\alpha_{12DN}$	na membrani in v notranjosti celice	kortikalno področje, malo v citoplazmi, manj lamelopodijev in stresnih filamentov	podobno kot brez dodatka agonista	podobno kot brez dodatka agonista
+ aktin + G $\alpha_{13DN}$	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G

4. Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30, 249–59.
5. Post GR, Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J* 1996; 10: 741–9.
6. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17:2201-10.
7. Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz T. Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2400–11.
8. Chow KB, Leung PK, Cheng CH, Cheung WT, Wise H. The constitutive activity of ghrelin receptors is decreased by co-expression with vasoactive prostanoid receptors when over-expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2627–37.
9. Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 19003–8.
10. Rediger A, Piechowski C, Yi CX, et al. Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* 2011; 286: 39623–31.
11. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front Neurosci* 2013; 7: e148 (18 str.) <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2013.00148/full> (11. nov. 2014)
12. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor sub-type 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1772–85.

## **Characterization of morphological alterations in HEK-293 cells, transfected with mutants of ghrelin receptor (GHS-R1a), impaired in ligand binding or signaling**

One of the drug target candidates to decrease appetite is a seven transmembrane (7TM) ghrelin receptor (GHS-R1a). We have defined the impact of individual amino acids in the third and sixth transmembrane region that have an impact on the activation of the second messenger systems or on the ability of ligand binding. The effect of changes in the mutated receptors on the shape, size of the cells and redistribution of cell actin filaments and microtubules and the role of G-proteins in the cytoskeleton redistribution was determined. Wild type and mutants of the GHS-R1a were cotransfected with dominant negative mutants of G-proteins, expressed in HEK-293 cells and shown by the confocal microscopy. We have demonstrated that  $\alpha$  subunits of G proteins  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$  had role in the rearrangement of the actin cytoskeleton and microtubules. In highly constitutive GHS-R1a mutant even more pronounced changes were observed. In receptor mutated in conserved DRY motif differences in polymerization of microtubules were observed. Similar cell morphology phenotype and the rearrangement of cytoskeleton were observed in the cells co-expressing mutants of GHS-R1a with disabled ligand or signal transduction function in comparison to GHS-R1a.

Key words: ghrelin receptor; mutagenesis; appetite regulation; HEK-293 cells



# ZACTRAN

SWINE



## Strike out SRD!

ONE-SHOT BAKTERICIDNI ANTIBIOTIK ZA ZDRAVLJENJE  
RESPIRATORNIH BOLEZNI PRI PRAŠIČIH

## Zdaj se

ZACTRAN® lahko uporablja tudi pri prašičih!



- ☑ **Baktericidno delovanje** | izjemno hitro učinkovanje na širok spekter povzročiteljev SRD
- ☑ **Fast-in** | hitra (v 30 minutah preseže minimalno inhibitorno koncentracijo v pljučih) in dolgotrajna akumulacija v pljučih, tarčnem tkivu. Hitro učinkovanje za preprečevanje simptomov in poškodb pljučnega tkiva.
- ☑ **Visoka koncentracija** | v BAL celicah, prvi obrambni črti proti respiratornim okužbam
- ☑ **One-shot zdravljenje** | ni potrebe po večkratnem dajanju, manj stresa za živali
- ☑ **Varen** | tudi za mlade pujske
- ☑ **Dokazana učinkovitost** | kurativnega delovanja v različnih terenskih pogojih
- ☑ **Preprosto odmerjanje** | za širok razpon telesnih tež, primeren volumen odmerka, enostavno injiciranje zaradi dobre viskoznosti
- ☑ **Polipropilenske vial** | ergonomsko oblikovane in odporne na poškodbe



SAMO ZA STROKOVNO JAVNOST

VETPROMET



**Dejavnosti na področju  
veterinarstva**

Professional activities in  
veterinary medicine

---

# VETERINARSKA ZDRAVILA: NEVARNOST ZA ZDRAVJE IN OCENA TVEGANJA

Manica Černe

Samostojni strokovni delavec, Ljubljana, Slovenija

manica.cerne@gmail.com

Vsako zdravilo je v osnovi kemimična molekula, ki je v živem organizmu sposobna izzvati določen zaželen biološki odziv. Zdravilni učinek temelji na dnevnem odmerku, dolžini terapije in načinu vnosa v telo in je hkrati strogo vezan na bolezen in bolnika. V primeru, da ne govorimo o bolniku ampak o zdravem delavcu, potrošniku in okolju, vsako zdravilo prav zaradi svoje biološke učinkovitosti predstavlja določeno nevarnost za zdravje ljudi. Ocena nevarnosti za zdravje ljudi je postopek, ki temelji na znanih podatkih o zdravilu, ki so pridobljeni med razvojem zdravila (predklinične in klinične študije) ter v času prodaje in uporabe že registriranega zdravila (epidemiološke študije, študije primerov). Uporabni podatki so le tisti, ki so znanstveno in strokovno pridobljeni in utemeljeni. Ti podatki so podlaga za izračun različnih varnih mej izpostavljenosti določenemu zdravilu pri katerih ni vpliva na zdravje ljudi, kot so na primer dovoljen dnevni vnos z živili ali dovoljena mejna vrednost izpostavljanja na delavnem mestu. Ocena tveganja je postopek v katerem se opredeli nevarnost (zdravilo), čas izpostavljanja, količina zdravila kateremu smo izpostavljeni in način izpostavljanja ter se izračuna tveganje za določeno skupino ljudi v primeru, da je varna meja presežena. V okviru ocene tveganja se predpiše nadzor varnih mej in določi zaščitne ukrepe za zdravje ljudi, ki so v sorazmerju s presežkom varnih mej.

Ključne besede: nevarne zdravilne učinkovine; nevarnost za zdravje; ocena tveganja

## Uvod

V skupino zelo nevarnih zdravil štejemo kemoterapevtike, imunosupresive, hormone in hormonske modulatorje, ki so toksični v zelo nizkih odmerkih in so glede na način delovanja mutageni/genotoksični, karcinogeni ali reprotoksični in tudi zdravila z učinki na centralni živčni sistem ter zdravila, ki povzročajo alergične reakcije ali so dražljiva za kožo ali dihala pri nizkih odmerkih.<sup>(1-5.)</sup> Pri bolnikih, ki so nadzorovano izpostavljeni nevarnim učinkovinam, morebitne koristi zdravljenja odtehtajo tveganja zaradi neželenih učinkov, medtem ko je vsak učinek pri drugih ljudeh, po definiciji, neželen učinek. Z namenom varovanja zdravja ljudi so različne organizacije (WHO, OECD, EMA, FDA, ECHA in druge) začele vzpostavljati zakonsko podlago za zaščito zdravja različnih skupin ljudi, ki so lahko nenamerno izpostavljene zdravilom. Vzporedno so se razvijala orodja, baze podatkov in načini za kontrolo izpostavljenosti in kontrolo zaščite pred nenamerno izpostavljenostjo. Najprej je bilo zakonsko pokrito področje hrane preko katere je zdravilom lahko izpostavljen vsak potrošnik. Sledili so delavci na delovnem mestu v proizvodnji kemikalij in zdravil. V letu 2006 so stopila v veljavo priporočila za okolje, ki se nanašajo na izpostavljenost zdravilom preko vode iz okolja. Leta 2013 je EU sprejela regulativo za nenamerno izpostavljenost zdravilu za paciente, ki se nanaša na kontrolo proizvodnjih linij z namenom preprečevanja

kontaminacije enega zdravila z drugim in predpisala čistilne postopke in kontrolo le teh na proizvodnih linijah v farmacevtski proizvodnji.

## Material in metode

### *Varne meje*

Izračun varnih mej temelji na znanih podatkih o določenem zdravilu. Med temi podatki so najpomembnejši podatki o načinu delovanja zdravila na molekularni ravni, dnevni odmerki zdravil, ki na različnih vrstah laboratorijskih živali nimajo nobenega učinka (NOEL, no effect level) ali pa imajo le minimalen učinek (LOEL, low effect level), dnevni odmerki zdravila, ki pri pacientih nimajo farmakološkega učinka ali dnevni odmerki zdravila z minimalnim farmakološkim učinkom. S pomočjo predpisanih faktorjev in formule se iz zgoraj navedenih dnevni odmerkov in kritičnih neželenih učinkov izračuna varna meja izpostavljenosti. Postopek za izračun je predpisan<sup>(1,6)</sup> in se uporablja za izračun dovoljenega dnevnega vnosa zdravila s hrano (ADI, acceptable daily intake, mg/kg hrane/dan), ki varuje potrošnika; mejne vrednosti za poklicno izpostavljenost (OEL, occupational exposure level,  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), ki varuje delavce; PDE (permitted daily exposure,  $\mu\text{g}/\text{dan}$ ), ki varuje paciente in PNEC (predicted no effect concentration, mg/liter vode), ki varuje ljudi.

### *Nenamerna izpostavljenost zdravilu na delavnem mestu*

Delavec je nenamerno izpostavljen zdravilu preko vdihanega zraka, preko kontakta s kožo in s sluznicami, ob vrezninah, vbodih iz iglo in posredno s hrano in vodo, ki je bila v stiku z zdravilom. Največja možnost za nenamerno izpostavljenost delavcev v veterini je v prostorih kjer se pripravljajo infuzijske raztopine iz prašnih oblik zdravil, kjer se raztehtavajo prašnata zdravila v manjše odmerke, kjer se prašnata ali tekoča zdravila mešajo s hrano ali vodo, kjer se tablete drobij in mešajo s hrano.

### *Mejna vrednost za poklicno izpostavljenost z vdihovanjem*

Na splošno, mejna vrednost izpostavljanja na delovnem mestu predstavlja koncentracijo v zraku, ki ji je večina zaposlenih lahko izpostavljena od 8 do 10 ur na dan, 40 ur na teden, skozi celo delovno dobo, brez škodljivega učinka na zdravje<sup>(2,3)</sup>

Tveganje na delavnem mestu je določeno z nevarnostjo, ki jo predstavlja posamezno zdravilo in z verjetnostjo, da se nevarnost izrazi v obliki neželenega vpliva na zdravje delavca. V oceni tveganja na določenem delavnem mestu se upošteva dejanska časovna izpostavljenost posameznemu zdravilu, količina zdravila, delo z več zdravili v času osem urnega delavnika, prav tako se upošteva možen sinergističen učinek in različne stopnje nevarnosti, ki izhajajo iz saih zdravil. Nadzor dejanske izpostavljenosti določenemu zdravilu se opravlja z monitoringom. Monitoring koncentracije zdravila v vdihanem zraku se izvaja s posebnimi napravami, ki so nameščene na delavca v višini njegovega nosu in ust. Delavec lahko nemoteno opravlja delo in se giblje v prostoru, kjer je njegovo delavno mesto.



### *Mejna vrednost za poklicno izpostavljenost preko kože*

Izpostavljenost nastane pri direktnem kontaktu z zdravilom ali pri kontaktu s kontaminirano površino. Dovoljena dnevna izpostavljenost (permitted daily exposure, PDE) preko kože je izračunana na podlagi farmakokinetičnih parametrov kot sta absorpcija preko kože in biološka razpoložljivost po vstopu v telo. Na žalost pa ima le okoli 10% zdravil eksperimentalno določeno absorpcijo in biološko razpoložljivost po nanosu na kožo. Za namen ocene tveganja so določeni dogovorjeni korekcijski faktorji za biološko razpoložljivost in izračun mejne vrednosti za izpostavljanje preko kože. Nadzor dejanske izpostavljenosti preko kože ni možen. Monitoring kontaminacije površin se opravlja z odvzemom brisov iz delavnih površin in analizo vzorcev. V tem primeru izmerjene koncentracije ne opisujejo stopnjo izpostavljenosti delavcev ampak le neželjeno kontaminacijo okolice. V splošnem pa je zaščita kože zelo preprosta, saj je potrebno pri rokovanju z zdravili obvezno nositi rokavice.

### **Razprava**

Mejna vrednost za poklicno izpostavljenost je varna meja, ki glede na obstoječe znanje o zdravilu zagotavlja, da zdravilo ne bo povzročilo slabega počutja ali ogrozilo zdravja večine delavcev, ki so zdravilu izpostavljeni preko vdihanega zraka in so brez zaščitne opreme<sup>(4,5)</sup>. V različnih študijah so pri osebju, ki dela v onkologiji<sup>(1,2)</sup> dokumentirali nespecifične škodljive učinke na zdravje, kot so slabost, glavobol, bruhanje, draženje zgornjih dihalnih poti, kožni izpuščaji, izpadanje las in omotico. Kot dolgoročne škodljive učinke navajajo reprodukcijske motnje, genetske okvare, in raka<sup>(6)</sup>. Kumulativno tveganje za zdravje pri rokovanju z nevarnimi učinkovinami je odvisno od toksičnosti zdravila, izpostavljenosti in individualne občutljivosti<sup>(7)</sup>. Da bi čim bolj zmanjšali morebitne akutne ali dolgoročne učinke na zdravje, je priporočljivo, da se preprečijo ali vsaj zmanjšajo nenamerne izpostavljenosti tem zdravilom. Rutinski pregledi in ugotavljanje prisotnosti učinkovine v krvi ali urinu trenutno ni priporočeno za zaposlene, ki rokujejo s kemoterapevtiki<sup>(1)</sup>. Testiranje je priporočljivo samo za zaposlene, ki so bili akutno izpostavljeni učinkovini ob nesreči, kot je razlitje kemoterapevtika ali nenamerno iniciranje<sup>(4)</sup>.

Delodajalec je po vseh zakonskih predpisih in priporočilih odgovoren za zdravje zaposlenih. Odgovorna oseba, ki skrbi za varovanje zdravja delavcev poskrbi, da se določijo mejne vrednosti za izpostavljenost na posameznem delavnem mestu, da se kontrolira dejanska izpostavljenost in da se izvede oceno tveganja ter da se določi osebna zaščitna oprema na določenem delavnem mestu. Ko je znana nevarnost (katero zdravilo) in stopnja izpostavljenosti (količina zdravila in čas izpostavljenosti) je možno izdelati oceno tveganja na delavnem mestu. Na osnovi ocene tveganja na delovnem mestu se izvajajo različni ukrepi. Uvedejo se dodatni tehnični ukrepi na nivoju opreme, prostorov in zgradbe. K varnosti na delovnem mestu zelo veliko pripomore izobraževanje ljudi in njihova seznanjenost z nevarnostjo, ki jo predstavlja posamezno zdravilo s katerim rokujejo. Minimalna zaščitna oprema delavcev v bolnišničnih lekarnah in različnih ambulantah v prvi vrsti zaščititi kožo. Nujne so rokavice, ki so izbrane glede na lastnosti posameznega zdravila in očala. Za zaščito dihal so priporočene maske z določeno propustnostjo.

## Reference

1. Guidance Document for the Use of Data in Development of Chemical-Specific Adjustment Factors (CSAFS) for Interspecies Differences and Human Variability in Dose/concentration-Response Assessment. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.
2. IARC Monograph (2012) A review of human carcinogen pharmaceuticals. Vol 100A, Lyon.
3. IARC Monograph (2014). The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol 100B, Lyons.
4. NIOSH (2004). Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. Publication No. 2004-165.
5. NIOSH (2009): Personal protective equipment for health care workers who work with hazardous drugs. Publication No. 2009-106.
6. Schwartz, C.S.: A semiquantitative method for selection of safety factors in establishing OELs
7. Skov T, Maarup B, Olsen J, Rørth M, Winthereik H, Lynge E [1992]. Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Br J Ind Med* 49(12):855-861.

## Veterinary medicines: Health hazard and risk assessment

Each drug is essentially chemical molecule, which is capable of eliciting a specific desirable biological response in alive organism. The healing effect is based on a daily dose, length of treatment and mode of entry into the body and is also strictly linked to the disease and the patient. In the case that we are not talking about the patient but on the healthy worker, the consumer and the environment each drug represents a particular threat to human health because of its biological efficiency. The health hazard assessment is a process, based on the available data on the medicine, which are generated during the drug development (pre-clinical and clinical studies) and at the time of marketing and use of already authorized medicines (epidemiologic studies, case studies). Useful data are only those that are scientifically and professionally derived and justified. These data are the basis for calculating the different safe levels of exposure of particular medicine at which there is no effect on human health, such as, for example, the acceptable daily intake for food or permissible workplace exposure. The risk assessment is a process in which the hazard, exposure time, exposure concentration and the way of exposure are defined and the risk for a certain group of people is calculated in the case that safe limit has been exceeded. The risk assessment determine the control of safety limits and protective measures that are in proportion to the excess of safe limits.

Key words: hazardous pharmaceutical compounds; health hazard; risk assessment

# ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI V VETERINARSKIH PRESKUŠEVALNIH LABORATORIJIH

Tina Pirš

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

tina.pirs@vf.uni-lj.si

Veterinarski preskuševalni laboratoriji s svojimi rezultati igrajo pomembno vlogo pri prostem prometu z živalmi in živalskimi produkti, varstvu zdravja živali in tudi pri pristopu »eno zdravje«. Pri tem sta ključni kakovost laboratorijskega preskušanja in standardizacija, s katero dosežemo mednarodno primerljivost in prepoznavnost rezultatov. Uradni laboratoriji morajo slediti zakonskim zahtevam in biti po direktivi (EC) 882/2004 akreditirani po standardu ISO/IEC 17025, hkrati pa je zagotavljanje zanesljivih rezultatov in pravilnega preskušanja pomembno za vse uporabnike laboratorijskih storitev. Z akreditacijo laboratorij dokaže, da v procesu laboratorijskega dela sledi načelom kakovosti v vseh korakih – pred analitiko, med analitiko in po analitiki ter da je zavezan k stalnemu izboljševanju in učinkovitosti. Sistem kakovosti po tem standardu predstavlja tudi osnovo za nadgradnjo z drugimi sistemi kakovosti kot sta dobra proizvodna praksa ali dobra laboratorijska praksa v skladu za načeli OECD. Priporočila kodeksa dobre veterinarske prakse natančno opisujejo zahteve sistema vodenja kakovosti za vse veterinarske organizacije in so dobra osnova za pridobitev certifikata ISO 9001. Pomembna razlika med izvajanjem dobrega strokovnega dela v katerikoli veterinarski organizaciji in pridobitvijo formalne akreditacije ali certifikacije je v količini potrebne dokumentacije sistema kakovosti. Namen prispevka je predstaviti različne možnosti sistemov vodenja kakovosti v veterinarski medicini, prednosti in bremena formalne akreditacije ali certifikacije ter njihovo uporabnost iz primerov v praksi.

Ključne besede: zagotavljanje kakovosti; preskuševalni laboratoriji; veterinarska medicina

## Quality assurance in veterinary testing laboratories

Veterinary testing laboratories play an important role as providers of the test results that enable free trade of animals and animal products, animal health protection and also “one health” approach. The quality of testing and standardization are key factors for internationally comparable and recognized results. Official laboratories are required to be accredited to ISO/IEC 17025 by Regulation (EC) 882/2004. However, the guarantee of reliable results and soundness of testing are important for all users of laboratory services. Accreditation enables the laboratory to prove that the quality principles are followed in pre-analytical, analytical and post-analytical phases of the testing process. Laboratory is committed to continual improvements and effectiveness. The application of ISO/IEC 17025 standard can be a good basis for developing other quality systems such as good laboratory and manufacturing practice in accordance with OECD principles. The Code of Good Veterinary Practice describes the requirements relating to the quality management system within a veterinary organisation which are good basis to achieve ISO 9001

---

certification. The important difference between good professional work and gaining a formal accreditation or certification is the amount of quality system documentation. The purpose of this presentation is to introduce different possibilities of quality management systems in veterinary medicine, benefits and also burden of formal accreditation or certification and their practical application.

Key words: quality assurance; testing laboratories; veterinary medicine

# RAZVOJ INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE ZA PODPORO SPREMLJANJA IN OBVLADOVANJA BOLEZNI ŽIVALI V SLOVENIJI

Breda Hrovatin\*, Marko Potočnik, Jedrt M. Wernig, Tina Arič, Aleksandra Hari

Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Ljubljana, Slovenija

breda.hrovatin@gov.si

Zdravje živali ne vpliva le na proizvodnjo in njene ekonomske posledice, temveč lahko zoonoze tudi pomembno vplivajo na javno zdravje. Spremljanje in nadzor bolezni v realnem času in takojšnje ukrepanje so ključnega pomena pri zmanjševanju vplivov bolezni tako na samo zdravje in dobrobit živali kot tudi na zdravje ljudi in ekonomske posledice. Iz tega razloga je zgodnje odkrivanje bolezni in zmanjševanje časa, ki preteče med odkritjem, postavitvijo suma, potrditvijo, poročanjem in pripravo ter izvedbo ukrepov za obvladovanje izbruha, ključnega pomena. V ta namen je Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) oziroma njene predhodnice, vzpostavila in razvila (nadgradila) informacijski sistem za podporo spremljanja in obvladovanja bolezni živali, kar je močno pripomoglo k učinkovitejšemu spremljanju in upravljanju bolezni živali v državi. Od začetkov, ki jih je leta 1995 predstavljal program KUBO, ki je omogočal le beleženje pojavov na mesečni ravni in poročanje preko poštne izmenjave podatkov na disketah, sistem CIS VET EPI z integriranim sistemom GIS danes zagotavlja popolno sledljivost od odvzema vzorca skozi celoten proces do končnega rezultata preiskave oziroma potrditve pojava bolezni in priprave potrebnih ukrepov. Nadgradnje sistema v prihodnje vključujejo tudi IT orodja za spremljanje izvajanja ukrepov, kar bo učinkovitost službe ob morebitnih pojavih bolezni še povečalo. Razvoj informacijske tehnologije na področju zdravja živali pa predstavlja tudi velik napredek pri odpravi administrativnih bremen, saj omogoča neposredno komuniciranje z informacijskimi sistemi Evropske komisije in Mednarodne organizacije za zdravje živali, kamor redno poročamo o rezultatih spremljanja in pojava bolezni živali.

Ključne besede: zdravje živali; informacijski sistem; bolezni živali; obvladovanje bolezni

## Monitoring of diseases in the Republic of Slovenia and the information system EPI

Animal health not only affects production and its economic consequences, but zoonoses can also have a significant impact on public health. Disease surveillance and control in real time and immediate taking of actions are crucial in reducing the impact of the disease on both the animal health and welfare as well as on human health and economic consequences. For this reason, early detection of the disease and reducing of time that elapses between the discovery, suspicion, confirmation, reporting and the preparation and implementation of measures to control the outbreak is crucial. To this end, the Administration for Food

Safety, Veterinary Sector and Plant Protection (AFSVSPP) with its predecessor, established and developed (upgrading) information system to support surveillance and control of animal diseases, which significantly contributed to a more effective monitoring and management of animal diseases in the country. The beginning of information systems in the field of animal health in 1995 represented KUBO program, which allowed only recording of events on a monthly basis and reporting via regular mail exchanges data on diskettes. Nowadays CIS VET EPI with the integrated GIS system provides full traceability, from sampling through the entire process up to the final investigation result and confirmation of the occurrence of the disease and the preparation of the necessary measures. System upgrades in the future include IT tools to monitor the implementation of the measures, which will increase the efficiency of veterinary services in case of possible disease outbreaks.

The development of information technology in the field of animal health also represents a major step forward in the elimination of administrative burdens since it enables direct communication with the IT systems of the European Commission and the International Organization for Animal Health, to which we regularly report on the results of monitoring and the occurrence of animal diseases.

Key words: animal health; information system; animal diseases; disease management

# KOMUNICIRANJE S STRANKAMI V VETERINARSKI MEDICINI

Metka Kuhar

Fakulteta za družbene vede, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

kuhar.metka@gmail.com

V zadnjih nekaj letih se v veterinarski medicini (VM) razširja zavedanje o nujnosti obvladovanja komunikacijskih veščin. Predmeti o komuniciranju postajajo del predmetnikov veterinarskih fakultet, pojavljajo se tudi znanstvene raziskave in objave – slednjih je še vedno relativno malo, posebej v primerjavi s humano medicino. Komunikacijske raziskave na področju VM (izpostaviti velja recimo avtorico Jane Shaw) so največkrat zasnovane podobno kot pri humani medicini, in rezultati so precej podobni. V VM pa obstaja kar nekaj specifičnih tem, kot so evtanazija, pogostost veterinarjevega soočanja s smrtjo itd. Raziskave so zaenkrat zgolj s področja klinik za male živali.

V prispevku bom najprej predstavila nekaj pomembnih značilnosti komunikacije s strankami v VM, pri čemer bom izhajala iz tega, kar obstoječi znanstveni prispevki s področja izpostavljajo kot pomembne veščine. Te značilnosti bom predstavila v kontekstu družbenih trendov, kot so spreminjanje vezi med ljudmi in živalmi ter spreminjanje narave odnosa zdravnik/veterinar-stranka. Povzela bom tudi nekaj slovenskih podatkov o tem, kako stranke dojemajo komunikacijo z veterinarji, in sicer iz dveh študentskih raziskovalnih nalog. To so zaenkrat edini slovenski empirični podatki na to temo. V luči tega bom poudarila potrebo po raziskavah, tudi komunikacije s klienti na terenu (na farmah).

## Communicating with clients in veterinary medicine

In the last few years in veterinary medicine (VM) the awareness of the necessity of mastering communication skills is extending. Subjects on communication are becoming a part of the curricula of veterinary faculties, and also scientific research and publications are emerging - the latter are still relatively few, especially when compared with human medicine. Communication research in VM (for example, the researcher Jane Shaw shall be pointed out) is usually designed similar to human medicine, and the results are quite similar. However, in VM, there are some specific issues such as euthanasia, the frequency of the veterinarian confrontations with death, etc. Communication research exists only in the field of small animal clinics.

In this contribution, I will first present some important features of communication with clients in VM, based on the current scientific contributions in the field. These characteristics will be presented in the context of the current social trends, such as the changing bond between humans and animals, and the changing nature of the veterinarian-client relationship. I will summarize some Slovenian data on how clients perceive communication with veterinarians from two student research projects. These are so far the only Slovenian empirical data on the topic. In this light, I will emphasize the need for research, including the studies in the field (on farms).

**Proste teme**

Free topics

---



# VIRUSNE OKUŽBE ČEBELJIH DRUŽIN

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Vlasta Jenčič<sup>2</sup>, Metka Pislak Ocepek<sup>2</sup>, Urška Jamnikar Ciglencički<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, <sup>3</sup>Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Pri čebelah so ugotovili že 24 različnih virusov. Čeprav nekateri čebelji virusi povzročajo značilne klinične znake le pri visokih titrih virusa, pa se virusne okužbe v čebeljih družinah pogosto ohranjajo kot perzistentne okužbe, virusi pa v nizkih titrih ne povzročajo znakov bolezni. Na čebeljo družino ima okužba z enim ali hkrati z več različnimi čebeljimi virusi negativen vpliv, saj le-ti zmanjšujejo imunsko odpornost čebel in skrajšujejo njihovo življenjsko dobo. Hkratna prisotnost virusov, varoj in drugih patogenov tako pogosto vodi do propada čebelje družine. Ugotovitev in ocena stopnje klinične prizadetosti čebelje družine je še vedno osnovna metoda za ugotavljanje bolezni. Prednost te metode je njena robustnost, enostavnost, hitra izvedba in nizka cena. Ker pa virusne okužbe pri čebelah ne povzročajo vedno kliničnih znakov in tudi niso prisotne pri vseh predstavnikih čebelje družine in njihovih razvojnih stopnjah, različni virusi pa lahko povzročajo podobne klinične znake ali obratno isti virus povzroča različne klinične znake bolezni, je potrebno pri natančnejših ovrednotenjih virusnih okužb uporabiti specifične laboratorijske metode. Z različnimi molekularnimi metodami smo v preteklosti že pojasnili nekatere povezave med virusnimi okužbami in odmiranjem čebeljih družin kranjske čebele, za še boljše razumevanje teh povezav pa bodo potrebni multidisciplinarni pristopi, ki bodo pojasnili, kako učinkovito ugotavljati, spremljati in preprečevati virusne okužbe pri čebelah. Na predavanju bodo predstavljeni nekateri praktični pristopi in možnosti raziskav, ki jih omogočajo nove tehnologije.

Ključne besede: čebelji virusi; dokazovanje; RT-PCR; odmrle čebelje družine; kranjska čebela

## Viral infections in honeybee colonies

There are currently 24 viruses identified in honey bees. Although some bee viruses produce recognizable clinical signs only at sufficient elevated titers, viral infections generally persist naturally in honey bee populations at low levels without causing symptoms of the disease. The infection of honeybee colony with one or simultaneous infection with several different viruses have negative effect on bees, since it reduces the immune system of bees and their lifespan. The simultaneous presence of viruses, varroa and other pathogens can often lead to the collapse of bee colonies. The detection and the assessment of the clinical picture of affected honeybee colony is still basic method for diagnosing of the disease. The advantage of this method is its robustness, simplicity, rapid implementation and the low price. However, because many viral infections do not present clinical signs of the disease in colonies and are not present in all representatives of their life stages, different viruses can produce similar clinical symptoms or vice versa, the same virus can produce a variety of clinical signs, it is necessary to use specific laboratory methods for more precise evaluation

of viral infections. With a several molecular methods, we have previously explained some of the connections between viral infections and the death of honeybee colonies of Carniolan gray bee. For better understanding of these connections a multidisciplinary approach will be needed, to explain how effectively implement detection, monitoring and prevention of viral infection in bees. During the lecture some practical approaches and research opportunities by new technologies will be presented.

Key words: bee viruses; detection; RT-PCR; dead colonies; Carniolan honey bee

# VETERINARSKA STROKA IN NJENO MESTO PRI DELU JAVNE AGENCIJE REPUBLIKE SLOVENIJE ZA ZDRAVILA IN MEDICINSKE PRIPOMOČKE

Silvestra Kobal<sup>1\*</sup>, Tomaž Snoj<sup>1</sup>

Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

silvestra.kobal@vf.uni-lj.si

V prispevku so prikazana določila Zakona o zdravilih, ki omogočajo ustrezno sodelovanje veterinarske stroke s pristojnim državnim organom. Prikazana zakonska določila predstavljajo osnovo za uspešno reševanje vprašanj s področja dostopnosti zdravil tako lastnikom živali kakor tudi veterinarjem.

Ključne besede: zdravila; veterinarska medicina; zakonodaja

## Relacija med veterinarsko stroko in upravnim organom, pristojnim za področje zdravil

Z Zakonom o zdravilih (1) se v pravni red Republike Slovenije vsebinsko prenašajo direktive Evropske unije (EU) in na ta način urejajo določena vprašanja s področja izvajanja uredb EU, med drugim tudi s področja zdravil za uporabo v veterinarski medicini. Na osnovi zakonskih določil so predpisani pogoji in ukrepi za zagotavljanje ustrezne kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravil za uporabo v veterinarski medicini, pogoji in postopki za njihovo preskušanje, izdelavo, promet, uradno kontrolo in nadzor z namenom varovanja zdravja živali, javnega zdravja in okolja.

Glede na to, da zakon določa tudi pogoje, postopke in ukrepe za zdravila za uporabo v veterinarski medicini, je nujno in nepogrešljivo sodelovanje veterinarske stroke in pristojnega organa, Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP).

Za izvajanje nalog, ki jih določata Zakon o zdravilih (1) in Zakon o medicinskih pripomočkih (2), je zadolžen organ, pristojen za zdravila (JAZMP). Zakon določa, da pri JAZMP delujejo stalne in začasne komisije ter posamezni izvedenci. Komisije in posamezni izvedenci imajo posvetovalno vlogo in so strokovno neodvisni in samostojni v okviru svojega področja delovanja (1, 2).

Za področje ustrezne preskrbe Republike Slovenije z zdravili za uporabo v veterinarski medicini potrebuje veterinarska stroka predvsem optimalno sodelovanje oz. vključevanje posameznih strokovnjakov v delo JAZMP. S tem bi se tudi spoštovala zakonska določila s tega področja. Pri tem imajo, po naši oceni, velik pomen *Stalna komisija za zdravila za uporabo v veterinarski medicini*, ki je izvedenski organ na področju zdravil, kliničnih preskušanj in farmakopeje. Člane *Stalne komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini* imenuje minister, pristojen za veterinarstvo, izmed strokovnjakov s področja farmacije, veterine, farmakologije in drugih področij in ki jih na poziv organa, pristojnega za veterinarstvo, predlaga vrhunška veterinarska ustanova v Republiki Sloveniji oz. Veterinarska fakulteta. To poslanstvo je v samostojni Sloveniji vse od leta 1993 pa do leta 2008 uspešno opravljala *Komisija za zdravila za uporabo v veterinarski medicini* v

različni sestavi in to sprva pod okriljem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano oz. Veterinarsko upravo Republike Slovenije. Kasneje je delovala pod okriljem Ministrstva za zdravje, prvo kot posvetovalni organ njegovega Urada za zdravila in za tem JAZMP. To je bilo obdobje, ko je bila preskrba z zdravili za uporabo v veterinarski medicini na zadovoljivi ravni in ko je bilo sodelovanje vlagateljev vlog za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom v Republiki Sloveniji, izjemnega uvoza ter drugih postopkov, vezanih na zakonsko regulativo, in pristojnim organom za zdravila in medicinske pripomočke na zelo visoki strokovni ravni. V tem času so člani komisije kot eksperti iz posameznih področji aktivno sodelovali tudi pri številnih različnih postopkih pridobivanja dovoljenj za promet, tako po centraliziranem in decentraliziranem postopku, postopku medsebojnega priznavanja in še zlasti v številnih postopkih pridobivanja dovoljenja za promet po nacionalnem postopku. Po letu 2008 so se na področju sodelovanja *Stalne komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini* in JAZMP začele pojavljati težave, ki izvirajo v tolmačenju oz. razumevanju izraza »posvetovalna vloga«.

Od leta 2008 sta dva ministra, pristojna za veterinarstvo, imenovala kar tri komisije, ki pa jih JAZMP, kot ji nalaga veljavni Poslovnik komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (3), žal ni sklicala na ustanovno sejo. S tem JAZMP ni omogočila uradno imenovani *Stalni komisiji za zdravila za uporabo v veterinarski medicini*, da bi opravljala delo s področja njene pristojnosti ter pripravo in sprejemanje poslovnika komisije. V tem času se JAZMP z uradno imenovano stalno komisijo ni posvetovala niti o eni zadevi oz. vlogi.

Lahko rečemo, da je tudi preskrba z veterinarskimi zdravili ter nelegalni trg z zdravili za uporabi v veterinarski medicini in s tem njihova nenadzorovana uporaba v Republiki Sloveniji odraz takšnega ne sodelovanja deležnikov na področju zdravil za uporabo v veterinarski medicini.

Izvedence, ki sodelujejo pri delu pristojnih organov Evropske komisije, imenuje minister, pristojen za veterinarstvo (1). Na tem področju veterinarska stroka s svojimi strokovnjaki aktivno sodeluje vse od leta 2004.

Menimo, da bi bila preskrba z zdravili za uporabo v veterinarski medicini in nadzor nad zlorabo učinkovitejša, če bi se način dela *Komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini* in upoštevanje njenih priporočil vrnil na način, ki je na tem področju veljalo do sprejetja Zakona o zdravilih leta 2006 (4). Do takrat je bilo delo komisije v skladu s takrat še veljavnim Pravilnikom o komisiji za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (5). S tem bi veterinarska stroka imela veliko manj problemov glede uporabe zdravil pri živalih, ki se vključujejo v prehransko verigo človeka, in predstavljajo pomemben, a hkrati šibek člen v proizvodnji varne hrane. Pri tem ne smemo pozabiti, da moramo veterinarji pri svojem delu spoštovati tudi določila, ki jih s tega področja določa zakonodaja, ki ureja veterinarsko dejavnost.

## Zaključek

Imenovanje *Komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini* s strani ministra, pristojnega za veterinarstvo, ne sme biti samo formalno pravni akt, temveč obveza JAZMP, da komisijo kot posvetovalni organ vključi v svoje delo. Sklepe oziroma predloge navedene komisije, vezane na posamezno obravnavano vlogo, mora JAZMP v skladu z zakonskimi določili upoštevati oziroma z ustrezno strokovno obrazložitvijo ne upoštevati (1).

Na osnovi prikazanega menimo, da je rešitev trenutnih problemov na področju sodelovanja veterinarske stroke z JAZMP v doslednem spoštovanju zakonskih določil veljavnega zakona (1) ali v usklajenih spremembah zakonskih in podzakonskih določil s področja zdravil za uporabo v veterinarski medicini. S tem bi omogočili strokovni in ne le

birokratski pristop ob sprejemanju odločitev, vezanih na zdravila za uporabo v veterinarski medicini s strani JAZMP.

## Reference

1. Zakon o zdravilih. Uradni list RS, št. 17/14.
2. Zakon o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 98/09.
3. Poslovnik komisije za zdravila za uporabo v veterinarski medicini. JAZMP, 2008.
4. Zakon o zdravilih. Uradni list RS, št. 31/06.
5. Pravilnik o komisiji za zdravila za uporabo v veterinarski medicini. Uradni list RS, št. 69/00.

## **Veterinary profession and its role in the work of the public agency of the Republic of Slovenia for drugs and medical devices**

In the paper, some legislative provisions of the Drug Law which enable collaboration of veterinary profession and competent authorities are presented. Displayed legislative provisions are the basis for solving the issues of drugs accessibility to both, animal owners and veterinarians.

Key words: drugs; veterinary medicine; legislation

# UGOTAVLJANJE PETIH VIRUSOV V ODMRLIH ČEBELJIH DRUŽINAH V LETU 2015 V SLOVENIJI

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Danijela Rihtarič<sup>1</sup>, Metka Pislak Očepek<sup>2</sup>, Alenka Jurič<sup>3</sup>, Anita Vraničar Novak<sup>3</sup>, Ivo Planinc<sup>3</sup>, Lidija Matavž<sup>3</sup>, Mira Jenko Rogelj<sup>3</sup>, Martina Škof<sup>3</sup>, Suzana Skerbiš<sup>3</sup>, Vida Lešnik<sup>3</sup>, Vlasta Jenčič<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, <sup>3</sup>Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V letu 2015 smo v 197 vzorcih odmrlih čebeljih družin izvedli ugotavljanje prisotnosti petih čebeljih virusov, kar je največja tovrstna študija izvedena v enem letu pri nas. Zbiranje in testiranje vzorcev je bilo prvič izvedeno v okviru letne Odredbe. V 94,31% zbranih vzorcev odmrlih čebel smo ugotovili nukleinsko kislino vsaj enega do petih čebeljih virusov. Z metodo RT-PCR smo nukleinsko kislino virusa črnih matičnikov (BQCV) dokazali v 85,79%, virusa deformiranih kril (DWV) pa v 56,35% vzorcev. Virus akutne paralize čebel (ABPV) smo ugotovili v 26,4%, virus kronične paralize čebel (CBPV) v 12,69% in virus mešičkaste zalege (SBV) v 5,58% pregledanih vzorcev. Prav gotovo je bila pomanjkljivost izvedene študije ta, da nismo zajeli vzorcev odmrlih čebeljih družin od februarja do aprila, na splošno pa ugotavljamo, da se opisana klinična slika v čebelji družini stopnjuje s številom ugotovljenih virusov v vzorcu in ob prisotnosti varoje. Virusne okužbe čebel so pogoste in prispevajo k izgubam čebeljih družin.

Ključne besede: čebelji virusi; dokazovanje; RT-PCR; odmrle čebelje družine; čebela

## Uvod

Medonosna čebela (*Apis mellifera*) s svojo opraševalno funkcijo omogoča ohranjanje raznovrstnosti rastlinstva v naravi ter igra pomembno vlogo v kmetijstvu, saj zagotavlja višje donose pridelkov nekaterim kulturnim rastlinam. Čebelarstvo ima v Sloveniji dolgo tradicijo in je zaradi pridobivanja številnih čebeljih pridelkov tudi pomembna gospodarska panoga. Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) je naša avtohtona vrsta in spada med zaščitene vrste ter je zato pod posebnim varstvom v naši državi. Čebelja družina je neprestano izpostavljena različnim dejavnikom in spremembam v okolju, na katere se mora prilagajati. Neposredno je izpostavljena tudi številnim parazitom in škodljivcem ter patogenim mikroorganizmom, kot so pršice, virusi, bakterije in protozoarne bolezni. Kljub veliki sposobnosti regeneracije čebelje družine pa različni dejavniki pogosto privedejo do propada ene ali večjega števila čebeljih družin v čebelnjaku. V študiji pojavljanja šestih čebeljih virusov med leti 2007 in 2009 smo dokazali prisotnost virusa akutne paralize čebel (ABPV) v 40%, virusa črnih matičnikov (BQCV) v 83,3%, virusa kronične paralize čebel (CBPV) v 18,3%, virusa deformiranih kril (DWV) v 70%, Kašmirskega virusa (KBV) v 1,7% in virusa mešičkaste zalege (SBV) v 8,3% od prizadetih čebeljih družin (1). Študija ugotavljanja prisotnosti petih čebeljih virusov, ki smo jo izvedli v letu 2010, je potrdila prisotnost od enega do petih čebeljih virusov v skoraj vseh pregledanih vzorcih (2). Spremljanje pojavljanja čebeljih virusov v 18 panjih preko celotne sezone je pokazalo, da so virusi najmanj pogosto prisotni pri zalegi, sledijo panjske čebele, najpogosteje pa jih

ugotovimo pri pašnih čebelah (3). Zaradi tega so pašne čebele tudi najpogosteje uporabljen vzorec pri ugotavljanju virusnih okužb čebeljih družin (1, 2, 3, 4, 5). Namen testiranja je bil ugotoviti pogostost pojavljanja posameznega virusa v čebelji družini, prav tako pa sočasno zbrati podatke o pojavljanju klinične slike in prisotnosti varoje.

## Material in metode

V dogovoru z Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) smo v letu 2015 v okviru 29. člena Odredbe od meseca aprila do decembra 2015 zbrali 197 vzorcev čebel mrtvic (od 10 do 30 mrtvic iz brade ali panja) ali varoj ali vzorcev odmrle čebelje zalege. Vzorce so odvzeli v klinično prizadetih čebelnjakih specialisti Nacionalnega veterinarskega inštituta s posameznih regionalnih enot, za vse pregledane vzorce smo izdali poročila in rezultate posredovali UVHVVR preko sistema CIS-EPI-LIMS.

Vzorce smo homogenizirali in izolacijo RNA izvedli s komercialnim kompletom (QIAamp® viral RNA Mini, Qiagen Nemčija) po navodilih proizvajalca. Za izvedbo RT-PCR smo pripravili reakcijsko mešanico z reagenti kompleta QIAGEN® OneStep RT-PCR tako, da smo zmešali vodo, RT-PCR pufer, dNTP mešanico, par začetnih oligonukleotidov za specifični dokaz ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV, kot je bilo predhodno opisano (5). Rezultate za posamezni vzorec smo ovrednotili glede na prisotnost specifične velikosti produkta RT-PCR.

## Rezultati

Po visokem odstotku ugotovljenih pozitivnih vzorcev odstopata dva virusa, in sicer smo nukleinsko kislino virusa BQCV dokazali v 85,79% vzorcih, sledi virus DWV s 56,35% ugotovljenih pozitivnih vzorcev. Virus ABPV smo ugotavljali v 26,4% pregledanih vzorcev, virus CBPV v 12,69% vzorcev, nukleinsko kislino virusa SBV pa smo dokazali v 5,58% vzorcev. V 94,31% vzorcev smo potrdili prisotnost od enega do štirih čebeljih virusov. V 30,96% vzorcev smo ugotavljali prisotnost ene vrste čebeljega virusa, v 36,04% sočasno prisotnost dveh vrst čebeljih virusov, v 21,82% prisotnost treh vrst virusov, v 4,5% smo potrdili sočasno prisotnost nukleinske kisline štirih vrst virusov. Večje število virusov smo v vzorcih prizadetih čebeljih družin ugotavljali skupaj s hkratno prisotnostjo varoje.

## Razprava

Ugotavljanje petih čebeljih virusov je bilo v letu 2015 prvič izvedeno v okviru letne odredbe, zajelo pa je 197 vzorcev, kar je največja tovrstna študija izvedena v enem letu pri nas. V okviru izvedenih testiranj na pet čebeljih virusov smo vse vzorce čebel prvič sprejeli preko CIS-EPI-LIMS in tako tudi uvedli in preizkusili sistem za poročanje rezultatov za te vrste vzorcev. Pri posameznih čebeljih virusih ugotavljamo podobne odstotke, kot že pri predhodno izvedenih študijah, le da so odstotki ugotovljenih virusov tokrat nekoliko nižji, kar gre pripisati tudi poznemu začetku zbiranja vzorcev, šele z začetkom aprila. Primerjava rezultatov s prejšnjimi študijami pa kažejo, da so virusne bolezni v čebeljih družinah stalno prisotne, z značilnim odstotkom za posamezno vrsto virusa, najvišje za BQCV in DWV, sledi ABPV, CBPV in SBV. Prav gotovo je pomanjkljivost izvedene študije ta, da nismo zajeli vzorcev odmrlih čebeljih družin tudi že od februarja do aprila. To je obdobje, ko zaznavamo prizadetost in ugotavljamo uspešnost prezimitve čebeljih družin, vsekakor bi zato bilo potrebno s študijo nadaljevati vsaj še eno leto, da bi dobili celotno sliko virusnih okužb pri čebelah.

## Reference

1. Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencečki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič Maganja D. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov. Vet. Res.* 2012; 49: 89-96.
2. Toplak I, Zabavnik Piano J, Pislak Ocepek M. Ugotavljanje prisotnosti petih *čebeljih* virusov v vzorcih obolelih *čebeljih* družin v letu 2010. Ljubljana: Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, November, 2010. 48 str.
3. Jamnikar Ciglencečki U. Preučevanje virusnih okužb pri kranjski *čebeli* (*Apis mellifera carnica*): doktorska disertacija. Ljubljana 2013, 173 str.
4. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Prevalence and seasonal variations of six honey-bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 7185-7191.
5. Toplak I, Rihtarič D, Pisak Ocepek M et al. Poročilo o ugotavljanju petih *čebeljih* virusov v *čebeljih* družinah v letu 2015 v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2016. 17 str.

## Determination of five viruses in dead honeybee colonies in 2015 in Slovenia

In 2015 the study for the presence of five honeybee viruses has been carried out on 197 samples of dead bee colonies, which is the largest number of samples tested in one year in the country. The collection and testing of samples were for the first time performed within the annual decree. A nucleic acid of at least one to five honeybee viruses were detected in 94,31% of the collected samples of dead bees. RT-PCR demonstrated nucleic acid of the black queen cell virus (BQCV) in 85,79% and deformed wing virus (DWV) in 56,35%, the acute bee paralysis virus (ABPV) in 26,4%, the chronic bee paralysis virus (CBPV) in 12,69% and the sacbrood bee virus (SBV) in 5,58% of samples. The shortcomings of the study is that it was not able to collect samples of dead bee colonies from February to April, but in general, we find that the clinical picture described in the bee family increases with the number of viruses detected in the sample and in the presence of varroa. Viral infections are common in honeybees and contribute to the losses of bee colonies.

Key words: Honeybee viruses; detection; RT-PCR; dead bee colonies; honeybee





**Prehrana živali**

Animal nutrition

---

# MYCOTOXIN BIOMARKERS – ADVANCES, CHALLENGES AND LIMITATIONS

V. Nagl<sup>1\*</sup>, F. Berthiller<sup>2</sup>, U. Hofstetter-Schähs<sup>3</sup>, G. Schatzmayr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BIOMIN Research Center, Tulln, <sup>2</sup>Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism, Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Tulln, <sup>3</sup>BIOMIN Holding GmbH, Getzersdorf, Austria

veronika.nagl@biomin.net

Fusarium mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON), fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) or zearalenone (ZEN), are among the economically most relevant mycotoxins in livestock production. Whilst research has primarily focused on the effects of high levels of mycotoxins in the last decades, significant knowledge gaps still exist concerning the metabolism of mycotoxins, appropriate exposure assessment and diagnosis of mycotoxicosis. For the latter aspects, the biomarker approach – measuring either the mycotoxin (metabolites) or specific biological responses in body fluids – holds promising potential.

In principle, the biomarker approach enables a more individual and comprehensive exposure assessment than food/feed analysis. For the establishment of a mycotoxin biomarker, a correlation between the biological measure and the quantity of ingested mycotoxin is crucial, as well as robust assays and stability of analytes in stored samples (1). Recent advances in analytical techniques, especially in the field of liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), allow simultaneous detection of multiple biomarkers even at low levels in biological matrices. Thus, the number of epidemiological investigations employing biomarker methods to assess human mycotoxin exposure is constantly increasing.

However, the application of mycotoxin biomarkers for diagnostic purposes in farm animals is hampered by several factors. For example, recent studies highlighted major differences in the metabolism of DON between species. In addition, the levels of DON and its metabolites in blood vary markedly in dependence on sampling time point, sex or age of the animal (2). Consequently, the establishment of guidance levels for critical DON concentrations in blood or other biological fluids in livestock species is currently not reasonable. At the same time, biomarkers represent a valuable tool in scientific studies. Under controlled conditions, their application provides new insights into the toxicokinetics of mycotoxins. Furthermore, validated biomarkers are the most reliable measure to assess the effect of mycotoxin deactivating agents *in vivo* (3).

1. Turner PC, Flannery B, Isitt C, Ali M, Pestka J. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutr Res Rev* 2012, 25:162-179.

2. Dänicke S, Brezina U. Kinetics and metabolism of the Fusarium toxin deoxynivalenol in farm animals: consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. *Food Chem Toxicol* 2013, 60:58-75.

3. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP); guidance for the preparation of dossiers for technological additives. *EFSA Journal* 2012, 10: 2528.

# CINK, NAPREDEK IN RAZISKOVALNE PERSPEKTIVE

Katarina Pavšič Vrtač<sup>1\*</sup>, Jožica Ježek<sup>2</sup>, Jože Starič<sup>2</sup>, Gabrijela Tavčar Kalcher<sup>1</sup>, Breda Jakovac Strajn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, <sup>2</sup>Klinika za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

katarina.vrtac@vf.uni-lj.si

Cink (Zn) je vpleten v izredno široko paleto bioloških procesov in je esencialen za rast, razvoj in varovanje živih bitij pred boleznimi. Glede na WHO (World Health Organisation) je neuravnoteženost in/ali pomanjkanje cinka 11. vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti ljudi po vsem svetu. Pomanjkanje Zn lahko tudi pri živalih povzroči slabšo rast, zmanjšanje vnosa krme, izgubo dlake, kožne spremembe, prekomerno slinjenje in slabšo reprodukcijo. V oktobru 2013 se je začel evropski projekt COST TD1304, z imenom "The Network for the Biology of Zinc (Zinc-Net)", v katerem sodelujemo tudi strokovnjaki Veterinarske fakultete. V okviru tega projekta smo za določanje Zn v krmi vpeljali in validirali ustrezne analize postopke z najsodobnejšo tehniko indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS), pregledali vzorce silaž in rezultate statistično obdelali. Poleg objav ima projekt še štiri ključne cilje: (a) združevanje znanj med znanstvenimi, kliničnimi in industrijskimi partnerji; (b) nastajanje novih raziskovalnih idej, novih sodelovanj in standardizacijo metodologij; (c) vzpostavitev spletnega portala za razširjanje znanja in komunikacijo ter (d) usposabljanje raziskovalcev, obveščanje javnosti in komuniciranje znanosti. Da bi lahko v to mrežo vključili čim več znanstvenikov, ki se ukvarjajo s cinkom, je pripravljena internetna stran VIZIBI (<http://zinc-net.com/>) na katero se lahko prijavite in aktivno sodelujete.

Ključne besede: cink; silaža; ICP-MS; COST TD1304

## Uvod

Cink (Zn) je vpleten v izredno široko paleto bioloških procesov in je esencialen za rast, razvoj in varovanje živih bitij pred boleznimi. Glede na WHO (World Health Organisation) je neuravnoteženost in/ali pomanjkanje cinka 11. vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti po vsem svetu.

Cink je esencialna komponenta več kot 200 encimskih sistemov, ki sodelujejo pri presnovi ogljikovih hidratov, beljakovin in nukleinskih kislin, pri obnovi celic in njihovi delitvi ter pri transportu in izkoriščanju vitamina A in E. Poleg tega igra Zn glavno vlogo v imunskem sistemu in nekaterih reproduktivnih hormonih (1).

Hudo pomanjkanje Zn lahko pri živalih povzroči slabšo rast, zmanjšanje vnosa krme, izgubo dlake, kožne spremembe, ki so najbolj hude na nogah, vratu, glavi in okoli nosnic, prekomerno slinjenje in slabšo reprodukcijo. Tako pomanjkanje Zn pri živalih je redko, je pa bilo opaženo pri pašnih živalih. Obseg marginalnega in subkliničnega pomanjkanja ni znan, vendar pa je verjetno zelo razširjen. Na podlagi študij z dodajanjem cinka v hrano je bilo ugotovljeno, da subklinično pomanjkanje lahko povzroči motnje reprodukcije in zmanjšano telesno težo živali (2).

Pomanjkanje Zn pri živalih namenjenih za prehransko verigo človeka in njihovih proizvodih privede tudi do pomanjkanja tega elementa pri ljudeh.

## Material in metode

Za preučevanje Zn v krmi smo vpeljali in validirali ustrezne analizne postopke. Uporabili smo najsodobnejšo metodo indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS). Za pripravo vzorcev smo uporabili razklop z dušikovo kislino in vodikovim peroksidom v zaprtem mikrovalovnem sistemu (3). Vzorce silaž, odvzetih na kmetijah po Sloveniji, smo analizirali in dobljene podatke statistično obdelali (4).

## Rezultati

Vsebnosti Zn smo določili v 30 vzorcih travne silaže in 30 vzorcih koruzne silaže (4). Povprečna vsebnost Zn v travni silaži je znašala 30,6 mg kg<sup>-1</sup>, vsebnosti v posameznih vzorcih pa so bile v območju med 20,9 in 77,5 mg kg<sup>-1</sup>. Nasprotno pa je povprečna vsebnost Zn v vzorcih koruzne silaže znašala 23,9 mg kg<sup>-1</sup>, vsebnosti pa so bile v območju med 13.3 in 35.9 mg kg<sup>-1</sup>.

## Razprava

Najmanjša priporočena vsebnost Zn v krmi za govedo je 25 mg kg<sup>-1</sup>, kar pomeni da hranjenje govedi s krmo, ki ima za osnovo travno silažo, ne predstavlja tveganja za pomanjkanje Zn. Vsebnosti Zn pa so glede na priporočene vrednosti prenizke v koruznih silazah, zato je potrebno Zn v teh primerih v krmo dodajati. Glede na dobljene rezultate bi bilo smiselno v rejah, kjer se pojavljajo težave z reprodukcijo in infekcijami (vključno z mastitisom) pogledati tudi, kakšna je preskrbljenost živali z Zn.

Z raziskavo smo vključeni v evropski projekt COST TD1304 (5), z imenom "The Network for the Biology of Zinc (Zinc-Net)", ki je financiran s strani Evropskega sodelovanja na področju znanosti in tehnologije (COST). V okviru tega projekta smo za določanje Zn v krmi vpeljali in validirali ustrezne analizne postopke z najsodobnejšo tehniko ICP-MS, pregledali vzorce silaž in jih statistično ovrednotili (3,4). Projekt združuje različne znanstvenike od kemikov, biologov, nutricionistov, zdravnikov in zdravstvenih delavcev do drugih uporabnikov, kot so različne industrijske interesne skupine in politike. Poleg objav ima projekt še štiri ključne cilje: (a) združevanje znanj med znanstvenimi, kliničnimi in industrijskimi partnerji; (b) nastajanje novih raziskovalnih idej, novih sodelovanj in standardizacijo metodologij; (c) vzpostavitev spletnega portala za razširjanje znanja in komunikacijo ter (d) usposabljanje raziskovalcev, obveščanje javnosti in komuniciranje znanosti. Ustanovljeno je bilo pet delovnih skupin, ki se redno srečujejo na sestankih delovnih skupin in sestankih upravnega odbora. Da bi lahko v to mrežo vključili čim več znanstvenikov, ki se ukvarjajo s cinkom, pa je pripravljena internetna stran VIZIBI (<http://zinc-net.com/>) na katero se lahko prijavite in aktivno sodelujete (5).

## Reference

1. Capuco AV, Wood DL, Bright SA, Miller RH, Britman J. Regeneration of teat canal keratin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1051-1057.
2. Spears JW. Minerals in forages. In: G. C. Fahey, Jr. (Ed.) *Forge Quality, Evaluation, and Utilization*. Madison: American Society of Agronomy, 1994: 281.
3. Pavšič Vrtač K, Jakovac Strajn, B, Salobir J, Tavčar Kalcher G. Validation of a

method for determination of 25 selected elements in feed by means of inductively coupled plasma mass spectrometry after closed vessel microwave digestion. V: Slovenski kemijski dnevi 2015, Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo 2015, 1-6.

4. Pavšič Vrtač K, Jakovac Strajn B, Salobir J, Šrimpf K, Tavčar Kalcher G. Study of trace and ultratrace elements in silage intended for cattle nutrition, *Slov Vet Res* 2016; 53 (1): 49-57.

5. Zinc-Net. The COST Action for Zinc Biology (online) <http://zinc-net.com/> (2.5.2016).

## Zinc, recent advances and research prospects

Zinc (Zn) is involved in an extraordinary range of biological processes and is essential for growth, development and protection of living organisms from disease. According to the World Health Organisation zinc imbalance and/or deficiency is the 11<sup>th</sup> leading cause of morbidity and mortality worldwide for humans. Severe zinc deficiency in cattle results in reduced growth and reduced feed intake, loss of hair, skin lesions, excessive salivation and impaired reproduction. In October 2013 the COST TD1304 action “The Network for the Biology of Zinc (Zinc-Net)” was started. Veterinary Faculty also takes part in this action. In this project we introduced and validated the most advanced analytical procedures for the determination of Zn in feed with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The silage samples were analysed and statistically evaluated. The next four key objectives of Zinc Net are: (a) defragmentation of the knowledge base across scientific, clinical and industrial partners; (b) generation of new research ideas, collaborations and standardization of methodologies; (c) establishment of a web-based portal for dissemination and communication and (d) researcher training, public outreach and communication of science. To include as many “zincologist” in this network as possible the Zinc Net website VIZIBI (<http://zinc-net.com/>) was established and all scientists are invited to join this network.

Key words: Zinc, silage, ICP-MS, COST TD1304

# Spasmium®

Takojsnje olajšanje.



- Metamizol 500 mg/ml, Butilskopolamin 4 mg/ml raztopina za injiciranje
- Ciljne živalske vrste - konji, govedo, prašiči, psi
- 2 x 2 formula - dve aktivni učinkovini, dvojno delovanje
- Multi modalni pristop - spasmolitik, analgetik, antipiretik
- Pametna potenca - takojsnje olajšanje zaradi trenutnega delovanja

**Spasmium comp. 500 mg/ml + 4 mg/ml raztopina za injiciranje.** Navedba zdravilne učinkovine in drugih snovi: 1 ml vsebuje: **Zdravilna učinkovina:** Najnižev metamizol monohidrat 500,0 mg (kar ustreza 443 mg metamizola), Skopolaminijev butilbromid 4,0 mg (kar ustreza 2,76 mg skopolamina) **Pomožne snovi:** Fenol (kot konzervans) 5,0 mg **Indikacije:** zdravljenje kečev ali trajno povečanega tonusa gladkih mišic prebavil ali organov za izločanje urina in žolča, povezanega z bolečino. Samo pri konjih: spastične kolike. Samo pri govedu, prašičih, psih: podpoma terapija pri akutni driski. **Kontraindikacije:** Ne uporabite v primeru preobčutljivosti na zdravilni učinkovini ali na katero koli pomožno snov. Ne uporabite v primerih: razjed na prebavilih, kroničnih boleznih prebavil, mehanskih stenoz v prebavilih, paralitičnega ileusa pri konjih, motenj hematopoeze sistema, koagulopatij, ledvične insuficience, tahiaritmije, glavkoma, adenoma prostate. **Posebni previdnostni ukrepi za uporabo pri živalih:** Raztopino, ki vsebuje metamizol, je treba pri intravenskem dajanju zaradi tveganja anafilaktičnega šoka dajati počasi. Samo za živali. Rp-Vet. Za nadaljne informacije preberite navodilo za uporabo.

Samo za strokovno javnost. Priprava: oktober 2016



080 13 15  
VETCONSULT PHARMA d.o.o.

richterpharma ag

**Kopitarji**

Equines

---



# VREDNOTENJE HEMATOKRITA IN SRČNEGA UTRIPA MED MEDIKAMENTOZNO IN OPERATIVNO ZDRAVLJENIMI PRIMERI KOLIK PRI KONJU

Vesna Kadunc Kos

Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

vesna.kadunc@vf.uni-lj.si

The majority of equine colic episodes resolve spontaneously or after medical treatment (80% - 85%) (1), but early decision of surgical vs. medical treatment is of imperative importance for survival of surgical colic cases. Horses requiring surgical treatment may be identified by certain physical examination and laboratory variables that provided the best predictive value. One study identified four variables (HR (heart rate), peritoneal fluid total protein concentration, blood lactate concentration and abnormal mucous membrane) during examination of 165 horses admitted for colic that were significant and entered into the model to calculate a colic severity score(2). In a case-control study in 4 groups of colic horses the ability to differentiate between surgical and medical treatment of colic horses with measurement of pretreatment/preoperative HR and PCV (packed cell volume) was assessed. Based on previous studies, which have found an association between HR or PCV and the colic severity score our hypothesis was that the PCV would be higher in horses requiring small intestinal surgical intervention than in horses requiring large colon surgery and in horses requiring medical treatment.

One hundred-twenty-five horses admitted to the teaching hospital were included. Twenty-nine were classified as requiring surgery for small intestinal strangulation obstruction and thirty-two for large colon displacement/evacuation and lavage, others were medical treated. An association between the need for surgical treatment in horses with small intestinal strangulation obstruction with more than 5 hours of colic duration prior admission to the hospital and a high PCV was found. In the early admitted group of horses (less than 5 hours of colic duration prior admission) with small intestinal strangulation obstruction no difference in PCV measurement and medical treated group of horses was found.

1. Tinker MK, White NA, Lessard P, et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J* 1997;29:448-53

2. Furr MO, Lessard P, White NA. Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic. *Vet Surg* 1995;24(2):97-101.

## Evaluation of packed cell volume and heart rate in medical versus surgical treated colic horses

80 – 85% kolik pri konju se reši spontano ali z medikamentoznim zdravljenjem (1), vendar je zgodnja diagnostika medikamentoznega oziroma kirurškega zdravljenja posameznega primera ključnega pomena za preživetje konja, ki potrebuje kirurško zdravljenje. Primere

ki potrebujejo kirurško zdravljenje se lahko diagnosticira na podlagi določanja kliničnih parametrov in laboratorijskih preiskav, ki zagotavljajo najboljšo napovedno vrednost. Študija, ki je na podlagi pregleda 165 konj napotnih na zdravljenje zaradi kolike ugotovila signifikantno spremenjeno vrednost štirih parametrov (srčni utrip, koncentracija skupnih proteinov v peritonealni tekočini, koncentracija laktata v krvi in abnormalna barva sluznic) je te parametre vključila v model za izračun jakosti kolik(2). Z raziskavo primerov štirih skupin konj zdravljenih zaradi kolike smo ugotavljali možnost razlikovanja med kirurškim oziroma medikamentoznim zdravljenjem konj s pomočjo merjenja hematokrita in srčnega utripa pred zdravljenjem oziroma pred operacijo. Na podlagi raziskav, kjer je bila ugotovljena povezava med srčnim utripom in hematokritom in jakostjo kolike pri konju je bila naša hipoteza, da je hematokrit višji v primerih, ki potrebujejo kirurško zdravljenje tankega črevesja kot v primerih, ki potrebujejo kirurško zdravljenje debelega črevesja in v primerih, ki so zdravljeni medikamentozno.

V raziskavo je bilo vključenih 125 konj, ki so bili napoteni na zdravljenje kolike na Veterinarsko fakulteto. Devetindvajset je bilo primerov, ki so potrebovali kirurško zdravljenje zaradi strangulacijske obstrukcije tankega črevesja, dvaintrideset primerov pa je potrebovalo kirurško zdravljenje zaradi premika/praznenja ascendentnega kolona, ostali primeri so bili zdravljeni medikamentozno. Ugotovljena je bila povezava med višino hematokrita in potrebo po kirurškem zdravljenju konj s strangulacijsko obstrukcijo tankega črevesja, pri katerih je čas trajanja kolike pred napotitvijo na kliniko presegal 5 ur. Med skupinama konj s strangulacijsko obstrukcijo tankega črevesja, kjer čas trajanja kolike pred kirurškim posegom ni trajal več kot 5 ur in medikamentozno zdravljenimi konji nismo ugotovili razlike v višini hematokrita.

# NOVOSTI NA PODROČJU SINDROMA ZAKOPITNICE

Milan Hren

Veterinarska bolnica Slovenska Bistrica, Slovenska Bistrica, Slovenija

milanhren73@gmail.com

Najpogostejši vzrok šepanja pri konjih je na področju pod biceljnim sklepom, natančneje na zadnjem delu kopita, kjer se nahaja tudi zakopitnica. Le-ta je del kopitnega sklepa, ki je zelo kompleksen in zaradi tega hitreje podvržen poškodbam. Sindrom zakopitnice se večinoma pojavlja na sprednjih okončinah in predstavlja boleče spremembe na kostnih ter mehkih strukturah kopitnega sklepa. Najpogostejši vzroki za sindrom zakopitnice so premalo gibanja, nenaravni načini gibanja, izvajanje nenaravnih hodov, pomanjkljivo vzdrževanje kopit, genetske predispozicije, reja večjih konjev, prevelika teža konjev in nenaravna vzreja žrebet. Zaradi teh faktorjev lahko pride do izgube blažilnih mehanizmov kopita, biomehničnega vpliva pritiska globoke upogibalke na zakopitnico, prevelike vlečne sile na nasadišča vezi in tetiv ter motnje v prekrvavitvi zakopitnega področja. Diagnostika sindroma zakopitnice je postala veliko bolj kompleksna kot šepanje na trdi podlagi v krogu, pozitivna palmarna anestezija in rentgensko vidni žilni kanali na zakopitnici. Opravljajo se lahko tudi ultrazvok pod kopitno strelco, magnetna resonanca in scintigrafija, ki je koristna za natančno določitev izvora bolečine. Terapija navikularnega sindroma lahko vključuje korekturno kovanje in obrezovanje, gibanje, sistemsko medikacijo, aplikacijo zdravil v sklep ali burzo, spiranje sklepa, vplivanje na rast kostnine, terapijo s pnevmatsko generiranimi valovi, neurektomijo in drugo.

Ključne besede: kopito; sindrom zakopitnice; podotrohloza; zdravljenje

## Uvod

Šepanje je eden izmed najpogostejših zdravstvenih težav konjev. Največkrat so prizadete sprednje okončine, zlasti kostne in mehke strukture kopitnega sklepa, ki ima zelo kompleksen mehanizem ter je podvržen velikim silam, zlasti pri športnih konjih. Del kopitnega sklepa je tudi zakopitna kost ali zakopitnica (*os naviculare*). Ker je zelo pomemben del sklepa in obsega veliko struktur, je bolje govoriti o kompleksu zakopitnice. Kadar na tem področju pride do patoloških sprememb, to imenujemo *sindrom zakopitnice*, lahko pa tudi *navikularni sindrom*, *podotrohloza* ali poljudno *hufrola*. Izraz *hufrola* izhaja iz nemščine (*Hufrolle*) in pomeni *zakopitnica*, v širšem smislu pa tudi vse strukture, ki so povezane z zakopitnico, ter patologije tega področja. V angleški literaturi je zaradi številčnosti struktur na tem področju govora o *palmarni bolečini kopita* (*palmar foot pain*), kar je zastavljeno še širše, saj je lahko vzrok bolečine katerakoli struktura na tem področju, ki ni neposredno povezana z zakopitnico. Sindrom zakopitnice v ožjem smislu še vedno obsega patološke spremembe na zakopitnici z burzo, v prilegajočih ligamentih, na sklepni površini okrog zakopitnice, v spodnjem delu globinske upogibalke, v pripadajočem krvožilju ali živčevju (1, 2).

Čeprav je sindrom zakopitnice zelo poznana patologija konjev in je o njej že veliko napisanega, je na tem področju še zmeraj prisoten primanjkljaj informacij ter uspešnega zdravljenja. Dosedanje teorije v praksi velikokrat ne držijo in se osredotočajo na preozek

vidik bolezenskega procesa, s čimer zanemarijo celostno sliko patološkega dogajanja. Nova dognanja nakazujejo primanjkljaj navajanja natančnih anatomskih osnov zlasti v izobraževalni literaturi. Prav tako so diagnostični pomen lokalnih anestezij okončin in rentgensko vidni žilni kanali na zakopitnici postali jasnejši. Pozitivna lokalna palmarna anestezija že nekaj časa ni več sinonim za sindrom zakopitnice. Z razvojem novih diagnostičnih metod lahko natančneje določimo, katere strukture so na področju zakopitnice prizadete in kako jih učinkoviteje zdraviti. Terapevtsko kovanje in neurektomija nista več edini možnosti (1, 2).

## Klinični znaki

Pri vsaki bolezenski spremembi se na področju kompleksa zakopitnice in okoliških struktur pojavi bolečina v fazi pristanka kopita, kar lahko spominja na znake bolečin v ramenu, saj je konju neprijetno postaviti nogo na podlago. Šepanje je bolj izraženo na trdi podlagi in v malem krogu (1, 2, 3). Test fleksije sklepov in palpacija s klešči sta lahko negativna, kar sindroma zakopitnice ne izključi. Bolezen se običajno razvije postopoma. Konji začnejo počasneje in previdneje stopati iz boksa ter se s težavo obračati na mestu. Pod jahačem se začnejo spotikati, zaustavljati pred ovirami zaradi bolečin pri pristanku, krajšati korake in neelastično gibati. Nekateri konji si v boksu pod pete nagrebejo nastelje, da razbremenijo globoko upogibalko. Konji nato začnejo blago šepati na eno ali obe sprednji nogi. Na tem področju lahko pride tudi do akutnega šepanja, kar je najpogosteje povezano s poškodbami na tem področju (1, 2).

## Vzroki

Tako kompleksna kot je bolezen sama, so tudi njeni vzroki. Za nastanek le-te je potrebnih več faktorjev, na katere vpliva človek. Zaradi tega je sindrom zakopitnice civilizacijska bolezen. Vsi faktorji slabijo kopitno osnovo in onemogočajo njeno prilagajanje (1, 3, 4).

### *Primanjkljaj gibanja*

Konji so grajeni za celodnevno neobremenjujoče gibanje, ki je pogoj za zdravo kopito. Danes so konji do 96 % časa omejeni na gibanje v boksu, kar onemogoča ohranjanje zdravega kopita in prilagajanje na večje obremenitve, ki so jim konji lahko izpostavljeni preostali čas (1, 2, 4).

### *Nenaravni načini gibanja*

Konjev gibalni aparat je v glavnem prilagojen gibanju naravnost, ne toliko intenzivnemu in dolgotrajnemu delu na krivuljah, ki je del vsakdana večine jahalnih konjev. Prav tako ne preskakovanju ovir. Sklepi za takšne obremenitve niso predvideni. Vlek na stranske vezi zakopitnice na krivuljah in povečan vlek na spodnjo vez zakopitnice na dolgi rok škodita strukturam zakopitnice, saj le-ta ni del okroglega sklepa. Verjetno imajo zaradi tega galoperji in kasači manj poškodb teh struktur. Pri njih je poškodba kopitnega sklepa posledica akutne preobremenitve kot pri vseh ostalih sklepih. Če se takšne konje uporablja kot običajne jahalne, preskakovalne ali dresurne konje, se tudi pri njih pojavi klasični sindrom zakopitnice (1, 2).

### *Izvajanje nenaravnih hodov*

Izdatnejši gibi, ki jih zahtevajo jahači in jih želijo zagotoviti tudi rejci, so za sklepe bolj obremenjujoči. Sila pri pristanku, sploh na petni del, se poveča (1, 2).

### *Pomanjkljivo vzdrževanje kopit*

Neprimerna in pomanjkljiva oskrba kopit je še vedno zelo aktualna težava, saj se v praksi velikokrat sreča konje, ki imajo neprimerno konstrukcijo kopita. Le-ta je lahko posledica neprimernega obrezovanja in kovanja ali pa je posledica težav v gibalnem aparatu, ki se odražajo na načinu obrabe kopita. V obeh primerih napačna konformacija kopita, npr. previsoka peta, predolgi prst, tanek podplat, kontrakcija pete itd., lahko povzroča patološke spremembe na strukturah v kopitu (1, 2).

### *Genetske predispozicije in slaba selekcija reje*

Reja športnih konjev še vedno daje prednost športnemu pedigreju konjev in ne zdravstvenemu stanju živali, saj so še vedno pomembni kratkoročni cilji doseganja rezultatov. Pri velikem številu konjev, npr. vestern konj, velikost kopita ni prilagojena njihovi masi, ampak imajo tudi polnokrvni konji velikokrat premalo razvita kopita (1, 2).

### *Reja večjih konjev*

Konjev ustroj je prilagojen na velikost, ki jo konji dosegajo v naravi. Le-ti so lažji in manjši od večine modernih konjev, ki so nagnjeni k sindromu zakopitnice. Pri reji večjih pasem je premalo poudarka na ostalih lastnostih konjevega telesa (1, 2).

### *Prevelika teža konjev*

Večina konjev ima prekomerno telesno težo, kar predstavlja dodatno obremenitev za sklepe. Tudi prevelika teža jahača ima negativen vpliv na kopitne strukture in druge dele telesa (1, 2).

### *Nenaravna vzreja žrebet*

Stabilnost ustroja in kopit se začneta oblikovati že v prvih mesecih življenja. Če v tem obdobju ni dovolj gibanja in raznolike podlage, ustrezen razvoj ni mogoč. Žrebeta, ki odraščajo v hlevu, imajo v primerjavi s tistimi iz proste reje v prvih petih mesecih slabši razvoj sklepov, ki ga kasneje ni več mogoče nadoknaditi (1, 2).

Zaradi teh faktorjev lahko pride do izgube blažilnih mehanizmov kopita ob obremenitvi (to so kopitni hrustanci, podplatna blazinica, prekrvavitev petnega dela, podplat, zagozda in povezava kopitne kosti s kopitno kapsulo), biomehničnega vpliva pritiska globoke upogibalke na zakopitnico, prevelike vlečne sile na nasadišča vezi in tetiv ter motnje v prekrvavitvi zakopitnega področja (1).

## Patogeneza

Patogene spremembe na kostnih ali mehkih tkivih imajo lahko različne poteke.

### *Degeneracija struktur, ki so namenjene blaženju sile pristanka v zadnjem delu kopita, in posledična kronična preobremenitev*

Oblika in kvaliteta kopita, sploh na področju pete in žabice, sta najpomembnejša faktorja pri nastanku sindroma zakopitnice. Le pravilno oblikovano kopito z dobro razvito žabico in funkcionalnim podplatom lahko služi kot blažilni mehanizem, ki okončine ter kopito ščiti pred škodljivimi vibracijami pri pristanku noge na tla. Tako kopito se lahko učinkovito prilagaja silam ob pristanku noge, ima stabilni zadnji del kopitne stene in čvrsto, dobro razvito žabico (1, 5, 4). Kadar se zaradi pomanjkanja gibanja pojavi nezadostna prekrvavitev področja in premalo stimulacije področja s hojo, se kopito ne more več prilagajati pritiskom. Zaradi napačnega kovanja ali obrezovanja, pa tudi napačne obremenitve noge, se kopito ne more prilagoditi in pride do poškodb kopitnih struktur. Zelo pogosto je povečanje pritiska globinske upogibalke na zakopitnico (1, 2, 3). Kopitni hrustanec se stanjša, krvožilje kopitnega področja degenerira in izgubi hidravlično blažilno funkcijo. Tkivo žabice izgubi vlaknasto strukturo, ki jo nadomesti maščoba. Tako postane mehko in neelastično, s tem pa izgubi blažilno funkcijo. Klinično je vidna atrofija žabice in zoženje petnega dela. Tudi okostenelost kopitnega hrustanca lahko vodi k motnjam kopitnega mehanizma (1, 2).

Konstantno in zmerno gibanje konja je pogoj, da se blažilni mehanizem kopita učinkovito razvije ter ohrani. Pomanjkanje gibanja pri konjih v današnjih časih ima zato usodne posledice. Prilagoditev gibalnega aparata konja na trenutne obremenitve tako ni mogoča. Gibalni aparat dodatno slabijo zahtevane vrste gibanja in predvsem velika količina gibanja na ukrivljenih linijah, pa tudi genetske predispozicije in reja žrebet v hlevih. Gibanje je ključno, ker hrustančne strukture v kopitnem sklepu črpajo hranilne snovi iz tekočine v sklepu med gibanjem, torej med obremenitvijo in sprostitvijo pritiska na hrustance. Mehanizem je podoben kot dodajanje moke pri gnetenju testa. Posledica je ob premajhni količini gibanja ali preobremenitvi enaka, hrustanec postane neelastičen in krhek. V skrajnem primeru lahko začne odmirati in prihaja do artroz. Vezi in tetive sicer črpajo hranilne snovi iz krvožilja, vendar so zelo slabo prekrvavljene, le 30–40 % v primerjavi z mišičnim tkivom. Ob obremenitvah se sprožijo tkivni hormoni, npr. prostaglandini, ki povečajo prekrvavitev pri obremenitvi tudi do 7-krat. S tem se tvori več tkiva in vezi; tetive se lahko ojačajo in s tem prilagodijo na obremenitve. Ta proces traja več tednov in se dogaja le ob gibanju konja. Tudi pri kostnem tkivu velja, da se pri konstantnih obremenitvah gostota tkiva poveča in obratno pri pomanjkanju gibanja zmanjša, kosti postanejo osteoporozne (1, 2).

### *Biomehantični vplivi pritiska globinske upogibalke na zakopitnico*

Oblika in robovi zakopitnice so določeni od žrebitve in vplivajo na odpornost zakopitnice na sile. Raven ali konveksen zgornji rob zakopitnice je zaželen, konkaven ali valovit zgornji rob pa ne. Zakopitnica in njene površine se tekom staranja obnavljajo. V kolikor so strukture preobremenjene, npr. povečan pritisk globinske upogibalke na zakopitnico, in blažilni mehanizmi ne delujejo, se tkiva začnejo prekomerno obnavljati; ta ključen proces postane patološki. Sprva zakopitnica izgubi na gostoti in postane šibkejša. Kasneje se kostnina pod drsno površino zakopitnice zadebeli, začne se sklerozacija in hrustanec spremeni svojo strukturo ter se začne prekomerno obrabljati. Nato v zakopitnici nastanejo

lokalne osteolitične ciste in globinska upogibalka se mestoma zlepi z drsno površino. Pri napredovani obliki bolezni se drsna površina odlomi ali dobi razpoke, globinska upogibalka pa se ob drsenju čez ta mesta poškoduje (1, 2, 3).

Pri 25 % zakopitnic imajo le-te na sredini drsne površine brezhrustančne cone, nekatere tudi razpoke. Cistične spremembe se lahko pojavijo neodvisno od patoloških sprememb v kopitu. V takšnih primerih se vidi centralni defekt, žilni kanali pa niso spremenjeni. Velikokrat so slučajne neboleče najdbe, ki lahko kasneje vseeno povzročijo šepanje (1).

#### *Prevelika vlečna sila na nasadišča vezi in tetiv*

Vezi in tetive so po zgradbi prilagojene razteznim silam, ne pa pritisku ali silam, ki nanje ne delujejo vzdolžno. Globinska upogibalka je sicer mestoma ojačana, vendar pri velikih konjih ne zdrži večjih obremenitev. Poleg klasičnih poškodb vezi in tetiv lahko ob vnetju pride tudi do poškodb hrustanca na drsni površini zakopitnice ali do vnetja burze. Prav tako se lahko tetiva zraste s površino zakopitnice ali z burzo, kar povzroča kronično bolečino. Do zraščanja lahko pride tudi zaradi sprememb na hrustancu zakopitnice. Spodnja zakopitnična vez ima stik s kopitnim sklepom in z burzo. Vnetne snovi iz sklepa, burze ali globinske upogibalke lahko pridejo preko krvožilja zakopitničnih vezi direktno v zakopitnico in povzročajo bolečine na področju teh vezi (1).

Nasadišče globinske upogibalke na kopitni kosti je lahko ob preveliki obremenitvi zelo boleče. Na tem mestu lahko pride tudi do dodatne osifikacije, kalcifikacije in robnih zlomov tetive. Enako se lahko zgodi tudi na nasadišču vezi. Te spremembe so običajno rentgensko vidne, niso pa nujno boleče. Povečano tveganje za nastanek teh sprememb je posledica nezmožnosti adaptacije kopita na sile, ki nanj delujejo, in s tem prekomernega obnavljanja kostnega tkiva tudi na mestu nasadišč tetiv ter vezi (1).

#### *Motnje prekrvavljenosti kopitnega področja z delno zaprtimi arterijami in iz tega izhajajoča nezadostna oskrba zakopitnice ali nefiziološki krvni pritisk v zakopitnici*

Zakopitnica je hitro izpostavljena motnjam prekrvavljenosti, saj žile vanjo vstopajo na spodnjem robu, kjer so izpostavljene pritisku sklepne tekočine kopitnega sklepa. Pri vnetju kopitnega sklepa je povečana tvorba sklepne tekočine, kar poveča pritisk v sklepu, saj je sklep omejen s kopitno steno in se sklepna kapsula ne more razširiti. Kadar je pritisk v kopitu dlje časa povečan, se spodnji rob zakopitnice začne obnavljati, žilni kanali (*canales sesamoidales*) se razširijo, deformirajo ali razcepijo. Žile so zaradi povečanega pritiska stisnjene, kar privede do motenj v prekrvavljenosti. Ker je pritisk v arterijah večji kot v venah, kri sicer pride v zakopitnico, vendar ne odteka. Pritisk v zakopitnici naraste (Kompartment Syndrom) in povzroča bolečine. Zdravila, ki povečujejo prekrvavljenost, so zato na mestu. Spremembe žilnih kanalov so zaradi tega v prvi vrsti znak obolenja kopitnega sklepa in komaj sekundarno v nekaterih primerih znak težav zakopitnice (1, 3).

Spodnja zakopitnična vez ima po novih dognanjih osrednji pomen pri upravljanju prekrvavljenosti zakopitnice v spodnjem delu globinske upogibalke in njenem nasadišču na kopitno kost. Preko specifičnih arteriovenskih kompleksov z mediatorjem »substanco P« regulira dotok krvi v sosednja tkiva. V kolikor blažilni mehanizem kopita ne deluje več, izginejo tudi receptorji za ta mediator in regulacija dotoka krvi ne deluje več. Dojemanje bolečine ostane ohranjeno (1).

Pri sindromu zakopitnice je prekrvavitev na področju zakopitnice sicer motena, vendar se naj ne bi več prištevala k razlogom za nastanek sindroma, saj eksperimentalno pri povzročeni

motnjah prekrvavitve ni mogoče izzvati sprememb, ki so tipične za sindrom zakopitnice (1).

## Diagnostika

Diagnostika sindroma zakopitnice je postala veliko bolj kompleksna kot zgolj šepanje na trdi podlagi v krogu, pozitivna palmarna anestezija in rentgensko vidni žilni kanali na zakopitnici. V zadnjem delu kopita je lahko pri enaki klinični diagnostiki obolelih več struktur, kar je težko ločiti od sindroma zakopitnice. Tudi spremembe, vidne z rentgenskimi žarki, so lahko neboleče, boleče pa so lahko nevidne. Prav tako je lahko klinična slika šepanja enaka drugim patologijam kopita, npr. vnetju, artrozam, cističnim tvorbam v kopitu, osteohondrozi, luksaciji ali zlomu kopitnega sklepa, zakostenitvam kopitnih hrustancev, poškodbam in deformacijam kopitne kapsule, kopitne stene ali celotnega kopita, abscesom, boleznimi bele linije, gnilobi žabice, rapam in drugo (1, 6).

Klinični pregled še vedno poteka po običajnem vrstnem redu, in sicer:

- anamneza;
- adspekcija struktur, okončin, konformacije in drže telesa;
- palpacija okončin in otip pulzacije žil nad kopitom;
- pregled gibanja v kasu na ravni liniji, v krogu, obračanje na sprednjih nogah na mehki, trdi in v idealnih pogojih še na neravni podlagi;
- fleksija sklepov spodnjega dela okončine;
- stisk podplata in žabice s kopitnimi kleščami;
- prevodne anestezije za določitev mesta bolečine (1, 6).

Šepanje nastane ali se poslabša pri kasanju na trdi podlagi ali na neravni podlagi. Značilno je krajšanje koraka naprej. Lastnikom se običajno zdi, da konj šepa zaradi bolečin v ramenu. Fleksije sklepov so za sindrom zakopitnice nespecifične. Pozitiven odziv na stisk podplata in žabice s kopitnimi kleščami je večinoma značilen za vnetje burze, usnjice in kopitne kosti. Nastane lahko tudi zaradi obolenja zakopitne vezi in nasadišča globinske upogibalke na kopitnici. Bolečina se v teh dveh primerih kaže na prehodu med sprednjo in srednjo tretjino podplata (1, 2).

Sum na sindrom zakopitnice predstavljajo zelo nizke pete kopita, saj je zakopitni kompleks zaradi tega bolj obremenjen (1). Kot med dorzalno kopitno steno in tlemi je pri primerni obliki kopita pri sprednjih okončinah 45–50° (7). Stisnjene pete so znak, da se konj izogiba stopanju na peto. Zaradi tega se lahko kopito napačno obrablja, pete so višje, prst pa kratek (1). Obe sprednji kopiti naj bi bili simetrični in vzporedni, brez rotacije prstov navznoter ali navzven. Prav tako mora biti linija od biceljnih kosti do kopitne kosti vzporedna s kopitno steno (7). V kasnejših stadijih obolenja so lahko prsti obrabljeni in imajo podplutbe. Šepanje je sprva sporadično, lahko tudi izmenično. V hujših oblikah postane konstantno in jasno razločno. Ker se obolenje navadno pojavi na obeh okončinah hkrati, je šepanje lahko tudi neopazno. Sindrom se v teh primerih kaže kot trda hoja in spotikanje (1, 2).

### *Prevodna anestezija*

Za določanje izvora bolečine je najbolj razširjena metoda prevodna anestezija, kjer se sicer določi boleče mesto, vendar ni mogoče določiti natančne strukture, ki povzroča bolečino. Prav tako obstaja možnost, da je bolečih več struktur ali da so boleče sekundarne



spremembe. Pri prevodni anesteziji se uporablja lidocain, prilocain ali mepivacain (1). Anestetik se lahko aplicira perinervalno ali intrasinovialno v kopitni sklep in navikularno burzo. Intrasinovialna aplikacija je bolj rizična zaradi večje občutljivosti sklepa za infekcijo in težjega lociranja burze (7).

Pri določanju sindroma zakopitnice se večinoma uporabi TPA oz. globoka palmarna anestezija, ki se izvaja na različne načine. Začne se lahko z anestezijo ramusa pelvinusa (RPA), kjer so anestezirani podplat brez petnega dela, zakopitnični kompleks in kopitni sklep. Nato lahko sledi TPA 1, kjer so anestezirani področje pete, cel podplat in stranske vezi kopita. Razlika med RPA in TPA 1 je težko opazna, zato nekateri začnejo direktno s TPA 1. Če anestetik apliciramo nekoliko višje, se anestezija imenuje TPA 2, kjer je anestezirana tudi dorzalna živčna oskrba. Anestezira se lahko tudi kopitni sklep ali burzo (1, 6, 7).

### *Rentgensko slikanje*

Za diagnostiko je rentgensko slikanje še vedno pomembno, čeprav na podlagi le-tega ni mogoče navesti zanesljive diagnoze, razen pri zelo spremenjenih strukturah (1, 2). Prav tako spremembe s to metodo pogosto niso vidne, kar pa ne pomeni, da sindrom zakopitnice ni prisoten (3). Opravijo se vsaj tri projekcije: lateromedialno, tangentialno in anterioposteriorno. Več kot je vidnih sprememb na zakopitnici, tudi, če niso izrazite, večja je verjetnost sindroma zakopitnice. Med zanesljive najdbe na rentgenskih slikah spadajo:

- sprememba drsne ploskve zakopitnice na tangentialni projekciji;
- mineralizacija globinske upogibalke;
- osteolitične spremembe in ciste;
- sklerozacija mozgovnega kanala (1, 2).

Če so prisotne te spremembe, so običajno vidne tudi spremembe na robu ploskve zakopitnice in spremenjeni žilni kanali, ki so lahko razcepljeni ali zadebeljeni. Sami žilni kanali ne zadostujejo za postavitev diagnoze. Nahajajo se na spodnjem robu zakopitnice in vodijo v mozgovni kanal. Prav tako se na rentgenskih slikah ne vidi mehkih tkiv, kjer se spremembe pojavijo prej (1, 2).

### *Ultrazvok*

Čeprav je za ultrazvočni pregled struktur zakopitničnega kompleksa na voljo le majhno okno v žlebu žabice, so poškodbe mehkih struktur dobro vidne. S tem se je večinoma mogoče izogniti magnetni resonanci. Žabico je potrebno obrezati do globine, kjer leta postane mehkejša in vlažna. Delni pogled na zakopitnico je mogoče dobiti tudi preko vdolbine na svitku (1, 7).

### *Magnetna resonanca*

S to metodo so vidne vse strukture, od kosti in hrustanca do različnih tekočin. Zaradi tega je razmah magnetne resonance močno izboljšal diagnosticiranje poškodb okončin in kopita (1, 4, 7). Nekoliko slabše so vidne spremembe zagozd kopita in mineralizacije mehkih tkiv (8). Pregled se lahko izvede v polni anesteziji ali sedaciji, na ležeči ali stoječi živali. Večinoma se pregled opravi na stoječi živali. V tem primeru je ločljivost sicer slabša, vendar zadostna (1, 3, 7).

### *Scintigrafija*

Pri tej metodi se uporabljajo blago radioaktivne snovi, ki se nalagajo na kostna področja s povečanim metabolizmom. Večinoma se uporablja Technetium99, ki se aplicira intravenozno. Konj mora zaradi izločanja radioaktivnih snovi iz telesa vsaj tri dni ostati na kliniki. Z gama kamero se dve do štiri ure po aplikaciji izmeri nivo radioaktivnih snovi v kosteh. Na ta način se vidi, kje prihaja do procesa razgradnje kosti in bolečine. To je koristno, če je z drugimi diagnostičnimi metodami vidnih več sprememb, vendar ni jasno, katera od le-teh povzroča bolečino. Slika je sicer nenatančna in pikčasta, vendar koristna za določitev ožjega področja bolečine (1, 7, 9).

### *Računalniška tomografija*

V primerjavi z magnetno resonanco je dražja in manj natančna (1). Prav tako slabše prikaže spremembe globinske upogibalke na distalnem delu proksimalnega dela zakopitnice (8). Konj mora biti v polni anesteziji (1).

### *Artroskopija*

Zaradi majhne diagnostične vrednosti ni toliko smiselna, saj je v kopitnem sklepu zelo malo prostora in ni mogoče pregledati veliko struktur. Prav tako zahteva popolno anestezijo (1, 7).

### *Termografija*

Je preprosta, vendar zelo nenatančna, saj prikaže le širše področje vnetnega procesa (1).

## **Terapija**

Zaradi večjih možnosti natančnejše diagnostike in s tem določitve patoloških struktur je lahko prognoza pri obolenjih zakopitnice bolj optimistična ob pogoju, da strukture niso preveč prizadete (1).

### *Ortopedska terapija*

Najpogosteje se še vedno uporablja korekturno kovanje, ki je za anatomijo kopita naravnejše kot običajno kovanje, in pravilno obrezovanje. Ponovno je potrebno usposobiti blažilni mehanizem kopita. Vse osi kopita je potrebno uravnovesiti in podplatu, steni ter žabici omogočiti ponovno nošenje teže. Prst kopita je po potrebi potrebno skrajšati in zaobliti, da je pregib kopita čez prst hitrejši. S tem je manj pritiska na zakopitnične strukture. Okrogle podkve dajejo žabici in zadnjemu delu podplata več opore. Preprečujejo prekomerno ugrezanje zakopitnice in globinske upogibalke (1, 4), vendar ne zmanjšujejo pritiska na zakopitno kost. Pri nekovanem kopitu je sila na zakopitne strukture za 14 % manjša kot pri običajnem kovanju (10). Prav tako je z rednim in pravilnim obrezovanjem brez kovanja mogoče vzpostaviti ustrezno obliko kopita, ki ojača blažilni mehanizem, npr. skrajšati prst in ojačati petni del (11). V akutnih primerih in večjih poškodbah globinske upogibalke ali vezi je pod peto primerno vstaviti podlogo, ki razbremeni tetivo in zakopitnico (1, 4). Sile naj bi bile manjše tudi do 24 % (10). To ni priporočljivo za daljše obdobje, saj se s tem poveča pritisk na petni del kopita in struktura žabice se poslabša (1, 10). V

nekaterih primerih, npr. slabo razviti žabici, je med podkev in žabico smiselno vstaviti podloge, ki lahko zmanjšajo tudi vibracije med podkvijo in kopitno steno. Konje z obolenjem zakopitnice je potrebno prekovati vsake pet do šest tednov. Ob akutnih poškodbah struktur zakopitnice mora konj najprej mirovati. Na splošno pa velja, da je za sindrom zakopitnice dobro gibanje, ki ni preveč obremenjujoče. Konja se postopoma navaja na zahtevnejše terene in trše podlage (1, 4).

### *Sistemska terapija*

Izboljšanja sindroma zakopitnice se lahko lotimo tudi sistemsko. Veliko se uporablja nesteroidna protivnetna sredstva, npr. phenylbutazon, ki blažijo le simptome (1, 12, 4). Zaščitno za hrustanec delujejo Adequan, glucosaminoglycan in glykosaminoglykan, ki jih je priporočljivo aplicirati intramuskularno. Preprečujejo razgradnjo hrustanca in so s tem bolj preventivna sredstva (1). Sredstva, ki vplivajo na regeneracijo kostnine, so kalzitonin, ki povečuje rast kostnine in se aplicira intramuskularno, ali tildronate disodium, ki zmanjšuje razgradnjo kosti in se aplicira intravenozno (1, 4). Obe sredstvi je mogoče aplicirati hkrati (1). V zadnjem letu je na tržišče prišel tudi clodronate disodium, ki je prav tako bifosfonat kot tildronat. Prav tako preprečuje razgradnjo kosti, lahko pa se aplicira intramuskularno. Imel naj bi tudi manj stranskih učinkov kot tildronat (13, 14).

### *Lokalna terapija*

Terapevtsko se lahko uporablja mehanska terapija s pnevmatsko-generiranimi valovi preko žabice ali preko vdolbine na svitku, ki ima največ učinka na poškodbe vezi in tetiv. Le-ta se ponovi dva- do štirikrat v razmaku dveh ali štirih tednov. V tem času je konju potrebno preprečiti preobremenitev okončine. Po terapiji je področje namreč do enega tedna brez bolečin (1, 4). Najverjetneje zaradi motnje sinaps živčnih končičev. Zaradi tega je Mednarodna konjeniška zveza FEI prepovedala izvajanje pnevmatsko generiranih valov do pet dni pred tekmovanjem (1). Mogoče je opraviti tudi dezmotomijo spodnje zakopitne vezi ali podporne vezi globinske upogibalke, kar zmanjša silo vleka. V primerih, kjer je konj v hudih bolečinah in ni nobene druge terapevtske možnosti več, se uporabi neurektomijo. V tem primeru konj še vedno čuti sprednji del podplata in se ga lahko jaha. Posebno pozornost pa je potrebno nameniti higieni kopit (1, 4, 15). Večina konjev neurektomijo dobro prestane, okrog 80 % se jih lahko uporablja v športu tudi več let po posegu, vendar ne za tekmovalne namene (15).

V sklep ali burzo se lahko aplicira tudi zdravila, kar je učinkovito zgolj ob poškodbah teh struktur. Za izboljšanje prekrvavitve na področju kopita se lahko uporabi isoxsuprin, ki razširi krvne žile. Poleg učinkovitosti je tudi cenovno ugoden. Podobno deluje tudi aspirin (1, 12, 4). Uporabi se lahko tudi metrenperone ali pentoxifylline, slednji naj bi obetal veliko (16). Sklep in burzo se lahko tudi spere. Večini konjev pomaga aplikacija manjše količine kortizona in hialuronske kisline (1, 12, 4). Pri tem je pomembno, da se konja po terapiji obremenjuje postopoma, saj lahko lastniki zaradi hitrega delovanja kortizona dobijo občutek, da je konj že zdrav, čeprav strukture niso imele dovolj časa za regeneracijo. Če so poškodbe prisotne na kosteh, ima kortizon le še funkcijo manjšanja bolečine. Za aplikacijo v sklep je primeren triamcionolon ali betamethason (1).

Lokalno se lahko aplicira tudi s trombociti obogatena plazma (PRP) in matične celice. Matične celice delujejo bolje v kombinaciji s PRP. Pri intraartikularni aplikaciji se bolje obnesejo matične celice, pridobljene iz maščobnega tkiva, so pa pri artritičnih spremembah

in poškodbah hrustančnega tkiva učinkovitejše matične celice, pridobljene iz kostnega mozga (17). Kombinacija matičnih celic in PRP z morfogennim proteinom-2 (BMP-2) se je izkazala kot uspešna pri aplikaciji direktno na poškodovana mesta kostnega tkiva, kjer sproži osteohondralno regeneracijo (18). Prav tako je varna in učinkovita aplikacija s kalcijevim dikloridom aktiviranega ali neaktiviranega PRP v kopitni sklep. Pri tem se PRP lahko pridobi tudi z gravitacijsko filtracijo, ne le s centrifugiranjem. Trombociti se v sinovialni tekočini ohranijo do 5 dni po aplikaciji v sklep (19). PRP po aplikaciji v sklep lahko sproži blago in samoomejujočo vnetno reakcijo, ki nima dolgoročnih posledic na homeostazo sklepa (20).

## Zaključek

Za preprečitev sindroma zakopitnice je potrebno skrbeti že od rojstva žrebeta. S pravilno oskrbo in predvsem z gibanjem na različnih podlagah se omogoči celosten razvoj kopitnega mehanizma. Le-temu sledi upoštevanje fiziologije konja, ki ni mišljena za nošenje prekomerne teže, in nenadne obremenitve brez ustreznega ogrevanja ter prostega gibanja konja čez dan. Prav tako je ključna ustrezna oskrba kopit, ki zagotavlja pravilno obliko in strukturo kopita.

Natančen vzrok nastanka sindroma zakopitnice še zmeraj ni znan. Blažilni mehanizem, ki je tesno povezan z nudenjem optimalnih pogojev za razvoj kopita in z vzdrževanjem kopita, je pomemben faktor. Oblika zakopitnice, ki je dedna, ima prav tako vlogo pri zmogljivosti kopita za opravljanje njegove funkcije. To bi bilo smiselno upoštevati pri rejnih smernicah. Nenadne obremenitve lahko povzročajo vnetja mehkih tkiv, kar se lahko prenese tudi na druge strukture v kopitu; prav tako lahko vpliva na konjevo hojo in s tem na obliko kopita. Kopito ima tudi specifično prekrvavitev, ki je lahko hitro motena, saj kopitna kapsula omejuje raztezanje tkiva ob poškodbah. Vsak izmed teh faktorjev je ključen za zdravo kopito. Neravnovesje enega predela, tudi kratkotrajna poškodba, lahko postane vzrok za sprožitev drugih patologij, kar je očem večinoma skrito, dokler se sindrom ne diagnosticira.

Terapevtsko je dobro sprva določiti vzrok za spremembe zakopitnega kompleksa in k terapiji pristopiti celostno. Konju je potrebno urediti prehrano, mu omogočiti čim več prostega gibanja in določiti zanj primeren nivo fizičnega dela. Ker je blažilni mehanizem kopita velikokrat prizadet in imajo konji s sindromom zakopitnice nepravilno strukturo ter obliko kopita, je le-to potrebno korigirati. Na področju kovanja velja razmisliti o tem, ali je lahko bosonog pristop dolgoročno uspešnejši pri zagotavljanju zdravega blažilnega mehanizma. Z ortopedskim kovanjem pri sindromu zakopitnice bi radi zmanjšali pritisk na strukture zakopitnice, ga porazdelili po celotnem podplatu in kopitni steni, ojačali žabico in blažilni mehanizem, kar je vse pri nekovanem in ustrezno vzdrževanem kopitu samo po sebi prisotno. Sistemsko lahko organizem podpremo s protivnetnimi sredstvi, sredstvi za razširitev krvnih žil, substancami, ki preprečujejo razgradnjo hrustanca in kostnine ali pa spodbujajo rast kostnine. Lokalno lahko na mestih spremembe apliciramo sredstva za razširitev krvnih žil, kortizone, matične celice, PRP, BMP-2 ali hialuronkso kislino. Mehansko lahko lokalno uporabimo pnevmatsko generirane valove preko žabice ali preko vdolbine na svitku, dezmotomijo vezi in v zadnji fazi tudi neurektomijo.

Na področju sindroma zakopitnice smo prišli do novih spoznanj, zlasti pri patogenezi in diagnostiki. Z različnimi diagnostičnimi postopki, ki so nam danes na voljo, smo prišli do spoznanja, kako kompleksni so kopitni mehanizmi in da je za določitev sindroma potrebnih več ugotovitev. Ne glede na izbor postopka zdravljenja je k sindromu zakopitnice potrebno pristopiti celostno in se truditi čim bolj uspešno ponovno vzpostaviti kopitni mehanizem.

## Reference

1. Bingold CA. Hufrollen syndrom. *EquiVetInfo* 2012. 60 str. <http://www.hufrollen-syndrom.de/html/impressum.html> (18. sept. 2016)
1. Novick D. Understanding and Treating Navicular Disease. Douglas Novick DVM: *Veterinary Care for Horses* 2008. 9str. <http://www.novickdvm.com/navicula.htm> (18. sept. 2016)
2. Sampson SN, Schneider RK, Gavin PR, Ho CP, Tucker RL, Charles EM. Magnetic resonance imaging findings in horses with recent onset navicular syndrome but without radiographic abnormalities. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2009; 50(4): 339–46. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2009.01547.x/full> (17. sept. 2016)
3. Kaneps AJ. Diseases of the foot. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Limited, 2014: 251–47.
4. Foreman JH. Veterinary aspects of training event horses. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. 2nd ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2014: 1057–70.
5. Kaneps AJ. Diagnosis of lameness. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Elsevier Limited, 2014: 237–51.
6. Barr A. Musculoskeletal diseases. In: Taylor GR, Brazil TJ, Hillyer MH, eds. *Diagnostic Techniques in Equine Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Elsevier Limited, 2010: 250–285.
7. Vallance SA, Bell RJW, Spriet M, Kass PH, Puchalski SM. Comparisons of computed tomography, contrast-enhanced computed tomography and standing low-field magnetic resonance imaging in horses with lameness localised to the foot. Part 2: Lesion identification. *Equine Veterinary Journal* 2011; 44(2): 149–156.
8. Trout DR, Hornof WJ, O'Brien TR. Soft tissue- and bone-phase scintigraphy for diagnosis of navicular disease in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; 198(1): 73–77.
9. Willemen MA, Savelberg HH, Barneveld A. The effect of orthopaedic shoeing on the force exerted by the deep digital flexor tendon on the navicular bone in horses. *Equine Vet J* 1999; 31(1): 25–30.
10. Clayton HM, Gray S, Kaiser LJ, Bowker RM. Effects of barefoot trimming on hoof morphology. *Aust Vet J* 2011; 89(8): 305–11.
11. Kirker-Head CA, Feldmann H. Pharmacotherapy of joint and tendon disease. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Limited, 2014: 474–503.
12. Burlington Equine Veterinary Services. Osphos and Tildren 2011. 3 str. [http://www.bevet.com/services\\_and\\_treatments/treatments/osphos\\_and\\_tildren/](http://www.bevet.com/services_and_treatments/treatments/osphos_and_tildren/) (18. sept. 2016)
13. Food and Drug Administration. FDA Provides Equine Veterinarians with Important Information about TILDREN and OSPHOS for Navicular Syndrome in Horses. 2015. 5 str. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ResourcesforYou/ucm406581.htm> (18. sept. 2016)
14. Gutierrez-Nibeyro SD, Werpy NM, White NA, Mitchell MA, Edwards RB, Mitchell RD, Gold SJ, Allen AK. Outcome of palmar/plantar digital neurectomy in horses with foot pain evaluated with magnetic resonance imaging: 50 cases (2005–2011). *Equine Vet J* 2015; 47(2): 160–4.
15. Turner TA. Treatment of Palmar Foot Pain. *Veterinary Information Network* 2009. 2 str. <http://www.vin.com/doc/?id=4060248> (30. okt. 2016)
16. Vlahos TP. Regenerative Medicine: Stem Cell Therapies in Equine Practice. In: American Board of Veterinary Practitioners symposium: proceedings. New Orleans: American Board of Veterinary Practitioners, 2015: 3 str. <http://www.vin.com/doc/?id=7000012> (20. okt. 2016)

17. Tsuzuki N, Seo JP, Yamada K, Haneda S, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. The effect of a gelatin  $\beta$ -tricalcium phosphate sponge loaded with mesenchymal stem cells (MSC), bone morphogenic protein-2, and platelet-rich plasma (PRP) on equine articular cartilage defect. *Can Vet J* 2013; 54(6): 573–80.

18. Textor JA, Tablin F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Vet Surg.*2013; 42(5): 499–510.

19. Moraes APL, Moreira JJ, Brossi PM, Machado TSL, Michelacci YM, Baccarin RYA. Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: Clinical and laboratory aspects. *Can Vet J* 2015; 56(8): 831–8.

## Innovations in navicular syndrome treatment

The most common cause for lameness in horses is located under the fetlock joint, specifically on the back end of the hoof, where the navicular bone is located. The navicular bone is part of the coffin joint, which is a very complex structure and therefore subject to higher injury risk. Navicular syndrome typically affects the front limbs and causes painful changes in the bone and soft tissue surrounding the coffin joint. The most common causes for the formation of a navicular syndrome are lack of motion, unnatural modes of motion, breeding of unnatural gates, inadequate hoof maintenance, genetic predispositions, breeding of large horses, overweight horses and unnatural rearing of foals. All these factors can lead to loss of hoof amortisation mechanisms, excessive tractive forces on the ligament and tendon attachments, biomechanical impact of the deep digital flexor on the navicular bone, and blood supply disorders of the navicular area. Diagnostics of the navicular syndrome have become more complex than the traditional lameness evaluation on the hard circle, positive palmar diagnostic anaesthesiology and radiographically visible vascular channels within the navicular bone. Furthermore ultrasound of the hoof frog, magnetic resonance imaging and scintigraphy, which is useful in determine the exact location of pain, can also be used. Treatment of navicular syndrome can include corrective shoeing and trimming, increase of motion, systemic medication, intraarticular or bursa injections, joint flush, shock wave therapy, neurectomy and others.

Key words: hoof; navicular syndrome; podotrochlosis; treatment

# CHICKENS AND HORSES AS SENTINELS FOR EARLY WARNING SYSTEM IN PREVENTION OF HUMAN WEST NILE VIRUS INFECTIONS IN CROATIA

Vladimir Savić\*, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>3</sup>, Mirta Balenović<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Eddy Listeš<sup>4</sup>, Giovanni Savini<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Poultry Center, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; <sup>2</sup>Department of Microbiology and Infectious Diseases with Clinic, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; <sup>3</sup>Department of Virology, Croatian National Institute of Public Health, Zagreb, Croatia; <sup>4</sup>Regional Institute Split, Croatian Veterinary Institute, Split, Croatia; <sup>5</sup>OIE Reference Centre for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italy

v\_savic@veinst.hr

West Nile virus (WNV) infects wide range of vertebrates. Birds are the main reservoir of the virus which is transmitted by mosquitoes to other animals and humans. Humans and horses are particularly sensitive to the infection, and can develop neuroinvasive disease even with lethal outcome. We used chickens and horses as sentinels for detection of seasonal incursions of WNV. During a three-year period (2013-2015), a total of 1,717 serum samples from sentinel outdoor chickens and 8,131 serum samples from horses were tested for WNV antibodies using IgG ELISA. In addition, 278 serum samples from humans suspected of WNV infection and 1,778 serum samples from asymptomatic subjects were tested for WNV. 198 (11.53%) chickens, 665 (8.18%) horses as well as 22 (7.9%) humans suspected of WNV infection and 15 (0.84%) asymptomatic subjects were found to be positive. A significant correlation in geographical distribution of high WNV seroprevalence in tested animals with human WNV infections was found. Coordinated extensive monitoring of WNV infection in poultry and horses throughout Croatia, as an early warning system, enabled timely anti-epidemic measures, primarily thorough disinsection in affected areas. This resulted in prevention of mass occurrence of human neuroinvasive WNV infections as reported in certain neighbouring countries.

Key words: West Nile virus; poultry; horses; public health; Croatia

## Introduction

West Nile virus (WNV) is an emerging zoonotic pathogen with rapid global expansion. The virus circulation is confirmed in many countries of Mediterranean Basin and Southern and Central Europe. Birds are the main reservoir for West Nile virus while mammals, particularly humans and horses, represent dead end hosts (1). Infected birds usually do not show symptoms, although few avian species can suffer from severe disease even with lethal outcome. Geese and ducks are particularly sensitive to the disease and develop high viremia and severe symptoms. Mortality in young geese can be as high as 60%. On the other hand, infection in chickens and turkeys usually remain subclinical but with development of high titre antibodies and very low viremia. Hence, chickens can be used as sentinels for seasonal incursions of WNV which is usually introduced by migratory birds and transmitted by mosquitoes (2). WNV can cause neurological disease and death in

humans as well as in horses. The objective of this study was to use chickens and horses as sentinels for early detection of WNV in order to timely conduct appropriate anti-epidemic measures in Croatia.

## Materials and methods

During a three-year period (2013-2015), a total of 1,717 serum samples from sentinel outdoor chickens and 8,131 serum samples from horses were tested for WNV antibodies using IgG ELISA. In addition, 278 serum samples from humans suspected of WNV infection and 1,778 serum samples from asymptomatic subjects were tested for WNV IgM and IgG antibodies. WNV positive human samples were confirmed using virus neutralization test. Positive horse sera were retested using IgM ELISA in order to confirm current/recent WNV infection.

## Results

One hundred ninety-eight (11.53%) chickens, 665 (8.18%) horses as well as 22 (7.9%) humans suspected of WNV infection and 15 (0.84%) asymptomatic subjects were found to be positive. Of 585 positive horse sera, WNV IgM antibodies were found in 34 (5.81%) samples. A significant correlation in geographical distribution of high WNV seroprevalence in tested animals with human WNV infections was found. In addition, this coincided in regions contiguous to countries where high incidence of human neuroinvasive WNV infection was reported during the investigated period.

## Discussion

WNV infection has been confirmed in Croatia in both animals and humans (1, 3, 4). First cases of neuroinvasive infection in humans in Croatia were reported in 2012 with consecutive cases during the following years (3, 4). This required additional testing of animals as a sentinel model for detection of seasonal introduction of the virus (2). Coordinated extensive monitoring of WNV infection in poultry and horses throughout Croatia, as an early warning system, enabled timely anti-epidemic measures, primarily thorough disinsection in affected areas. This resulted in prevention of mass occurrence of human neuroinvasive WNV infections including deaths as reported in certain neighbouring countries.

## References

1. Barbić L, Listeš E, Katić S, et al. Spreading of West Nile virus infection in Croatia, *Vet Microbiol.* 2012, 159:504-8.
2. Chaskopoulou A, Dovas C I, Chaintoutis S C, et al. Detection and Early Warning of West Nile Virus Circulation in Central Macedonia, Greece, Using Sentinel Chickens and Mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013, 13: 723-32.
3. Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, et al. First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014, 14:82-4.
4. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, et al. First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection* 2014, 42: 689-95



# Manj je več ... z **Broadline™**

Notranje delovanje:  
Najširši spekter proti  
notranjim zajedavcem  
& NEMATODI  
TRAKULJE

Prvo zdravilo, ki se  
nanaša na kožo  
in deluje na vse  
pomembne zajedavce  
mačk; notranje in  
zunanje!

Širimo indikacije  
- *Notoedres cati*  
- *Aelurostrongylus*  
*abstrusus*

Edinstveno  
zunanje delovanje  
& BOLHE  
KLOPI



Najbolj celovito zdravljenje  
zajedavcev pri mačkah doslej.



Premium tehnologija in premium  
kvaliteta za najširši spekter zaščite  
in najbolj priročno dajanje doslej

- 4 učinkovine: Fipronil, (S)-metopren, eprinomektin in prazikvantel
- Najširši spekter delovanja: klopi, bolhe (odrasle in razvojne oblike), gliste, trakulje, srčne gliste, vezikalni črvi...
- Nanos zdravila na kožo z enim dotikom - prijazen do živali.
- Od 7 tedna starosti naprej.
- Takoj odpravi notranje zajedavce.
- Zaščita pred bolhami in klopi 1 mesec.

SAMO NA VETERINARSKI RECEPT.  
SAMO ZA STROKOVNO JAVNOST.

VETPROMET

MERIAL  Line  
DESIGNED FOR PETS MADE FOR VETS

**Prostoživeče živali in divje  
živali v ujetništvu**

Free living animals and wild  
animals living in captivity

---

# WILDLIFE FORENSICS: WHY VETERINARIANS SHOULD PARTICIPATE IN ANIMAL CRIME INVESTIGATIONS

Severin Krešimir<sup>1</sup>, Petar Džaja<sup>1</sup>, Želimir Radmilović<sup>2</sup>, Dean Konjević<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forensic and State Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Heinzelova 55, <sup>2</sup>Police college, Police academy, Ministry of Interior, Zagreb, Av. Gojka Šuška br. 1, <sup>3</sup>Department of Veterinary Economics and Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia

severin@vef.hr

The answer to the basic question of all investigation procedures at the crime scene, which is; “What actually happened?” can be given after consideration of all the relevant factors relating to the nature of the incident and its cause. Of course, a vital part of that answer comprises credible and valid material evidence, taken from the changes noticed to natural materials, such as traces and objects. Traces, and especially those of biological origin, are subject to change, which may occur from external influences or without them. Only by securing them and timely and interdisciplinary investigation is it possible to achieve the desired goal. It is an unwritten rule that every opportunity must be taken to be involved at the scene of an incident, whereby better consideration is assured of the incident as a whole, and the linking of individual elements (e.g. a variety of material evidence, witness statements etc.) to form a logical story, which becomes the basis for any legal case. Due to the specific characteristics related to animals, important facts or evidence may be overlooked, incorrectly interpreted, or underestimated, especially if the investigation is conducted by someone without expertise in the field. Therefore, the main aim of this study is to demonstrate the importance of a complete investigation procedure of the scene of an incident, with special reference to the role of veterinarians, supported by examples from practice related to wild animals, such as; an attack by an animal on another animal; a collision between a vehicle and an animal; smuggling of live, endangered and protected wild animals or their body parts; and unlawful killing and poaching, in the form of accidental or deliberate poisoning.

# OCENA USPEŠNOSTI CEPLJENJA LISIC PROTI STEKLINI

Peter Hostnik\*, Toplak Ivan, Danijela Rihtarič, Gorazd Vengušt

National veterinary institute, Veterinary faculty, Ljubljana, Slovenia

peter.hostnik@vf.uni-lj.si

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano izvaja sistematično izkoreninjanje stekline na odročju Slovenije z metodo peroralnega cepljenja lisic že od leta 1995. Uspešnost izvajanja cepljenja lisic lahko ocenimo na podlagi laboratorijskih preiskav lisic, uplenjenih na cepnem področju. Rezultati določanje prisotnosti virusa stekline, določanje biomarkerja in starosti lisic v kostnini in določanje specifičnih protiteles proti virusu stekline so jasen pokazatelj dolgoletne uspešnosti programa peroralnega cepljenja. Z letali odvzete vabe je odvzelo od 72,1% lisic starejših od 6 mesecev v letu 2011 do 85,5% lisic v letu 2015. Predstavljeni rezultati potrjujejo, da program peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji teče uspešno. Zanj je značilno, da se odstotek cepljenih lisic znotraj populacije iz leta v leto povečuje.

Ključne besede: steklina; eradikacija; biomarker

## Uvod

Vse do uvedbe obveznega cepljenja psov proti steklini v letu 1947, pa do uspešnega izkoreninjenja urbane stekline v letu 1953, je bila steklina v Sloveniji več stoletij resen zdravstveni problem. V letu 1973 se je ta bolezen ponovno pojavila in se razširila med populacijo lisic. Razvoj atenuiranih cepiv, primernih za peroralno uporabo je prinesel nove možnosti izkoreninjanja stekline, razširjene v populaciji divjih živali (1). Peroralno cepljenje divjih mesojedih živali, v našem prostoru prvenstveno lisic, je edini in že v mnogih državah preverjen in učinkovit način izkoreninjanja stekline. V Sloveniji smo prvo cepljenje lisic izvedli v letu 1988, s sistematičnim polaganjem vab dvakrat letno pa smo pričeli v letu 1995. V letu 1995 smo ugotovili 1.082 primerov steklih živali, število pa je v naslednjih letih drastično upadlo in se več let zaradi mejnega področja z Republiko Hrvaško, kjer se ni izvajalo cepljenje lisic, ohranjalo na letni ravni od 5 do 80 primerov. Zadnji primer stekle živali smo v Sloveniji potrdili v letu 2014. Vabe z ustreznim cepivom polagajo z letali, načrt pa predvideva da se na 1 km<sup>2</sup> položi od 20 do 25 vab (2). Poznamo različne načine nadzora uspešnosti cepljenja lisic. Računalniško podprt nadzor ob izmetu vabe iz letala evidentira točno lokacijo izmeta vabe, kar omogoča administrativno spremljanje opravljenega dela in izračun gostote položenih vab na posameznem področju. Ker je gostota populacije tarčnih živali in živalskih vrst, ki jim vabe niso namenjene, jih pa ravno tako odvezemajo (npr. divji prašiči), različna na posameznih področjih, lahko njihovo gostoto zgolj ocenimo, zato je potrebna še biološka kontrola uspešnosti cepljenja. Ovoj cepiva vsebuje tudi antibiotik tetraciklin, ki je v tem primeru v funkciji biomarkerja. Pri uplenjeni lisici, ki je odvzela vabo s cepivom lahko v kostnini dokažemo prisotnost tetraciklina, kar nam služi kot indikator odvzema vabe. Lisica, ki odvzame vabo, se z virusom v cepivu imunizira. Prisotnost specifičnih protiteles v krvi uplenjene lisice nam pove, da je žival zaščitena pred morebitno okužbo z virusom stekline. Za ovrednotenje končnih rezultatov, in s tem postavitev točne

ocene zaščite populacije lisic na določenem področju, je potrebno uplenjenim živalim tudi določiti starost na osnovi nalaganja cementa na zobno korenino. V skladu s priporočili OIE je potrebno na cepnem področju letno testirati vsaj 4 lisice /100km<sup>2</sup>.

## Material in metode

Od leta 1998 dalje uporabljamo za cepljenje lisic proti steklini cepivo Fuchsoral<sup>®</sup>, ki vsebuje virusni sev SAD B19. V obdobju od 2011 do 2015 smo na višino titra virusa v cepivu Fuschoral testirali 14 različnih serij cepiva, ki so bile uporabljene v Sloveniji. Titer virusa smo določali v 10 vzorcih cepiva posamezne serije. Pripravili smo 10-kratne razredčine cepiva v osmih ponovitvah. Razredčine smo prenesli v mikroploščo in dodali suspenzijo celične linije BHK21. Rezultate smo čitali po 48 urni inkubaciji na podlagi predhodno opravljenega testa direktnega imunofluorescenčnega testa. Titer smo izračunali po Spearman-Kärberjevi metodi (3).

V obdobju 2011 - 2015 smo na prisotnost biomarkerja testirali 3.556 (povprečno 711 vzorcev/leto) vzorcev lisic, uplenjenih v obdobju od januarja do konca oktobra. V ta namen smo lisicam iz spodnje čeljusti previdno odstranili spodnji podočnik (caninus) z delom kostnine in s prečnim rezom oddaljenim 0,3 cm od apeksa korenine pripravili cca 200 µm debelo zobno rezino s počasno žago IsoMet (Buehler, Nemčija). Rezino smo na prisotnost tetraciklina preiskali pod fluorescenčnim mikroskopom. Mesta, kamor se naloži tetraciklin, smo iskali v obzobni kostnini in na meji med cementom in dentinom. Biomarker fluorescira intenzivno rumeno barvo.

Pri določanju starosti lisice uporabljamo rezino, ki je bila pripravljena za določanje biomarkerja. Metoda določanja starosti sloni na opazovanju sekundarnega cementa, ki se nalaga ob korenino zoba skozi celo življenje v obliki svetlih in temnih prstanov. V zimskem obdobju se cement obarva temno, v poletnem pa je linija svetlejša. Preko leta se ustvari ena temna linija, ki nam omogoča intervalno določanje starosti živali preko celega njenega življenja. Starost določamo s pomočjo stereo mikroskopa.

V 2011 - 2015 smo tudi testirali 3.415 vzorcev lisic na prisotnost protiteles proti virusu stekline. Protitelesa smo določali v vzorcih krvi ali vzorcih torakalne tekočine, ki smo jih odvzeli ob sekciji. Prisotnost protiteles smo določali s komercialnim testom ELISA (BioPro, Češka). Rezultate smo vrednotili na podlagi primerjave optične gostote substrata dobljenega pri testiranju vzorca in pozitivne in negativne kontrole testa.

V istem obdobju smo tudi skupno testirali 1.0703 vzorcev divjih in domačih živali. Vzorce možganskega tkiva živali smo na prisotnost antigena virusa stekline testirali s testom direktne imunofluorescence. Uporabili smo komercialni konjugat firme BioRad. Vse pozitivne primere smo dodatno testirali z molekularno metodo RT-PCR, njihovim produktom pa smo določili nukleotidna zaporedja na osnovi katerih smo določali morebitno prisotnost cepnega virusa pri steklih živalih.

## Rezultati

V vseh serijah cepiva Fuschoral<sup>®</sup> smo potrdili prisotnost virusa stekline. Vse serije so vsebovale titer višji od 10<sup>6,0</sup> FFU/ml. Povprečni titer virusa v cepivu je znašal 10<sup>6,6</sup> FFU/ml.

Prisotnost tetraciklinov smo v obravnavanem obdobju dokazali pri 2.780 (78,2%) lisicah. Najnižji odstotek (76,6%) pozitivnih lisic na tetraciklin smo ugotovili v letu 2011, najvišji (85,5%) pa pri lisicah uplenjenih v letu 2015. Na prisotnost protiteles proti virusu stekline smo testirali 3.415 vzorcev krvi ali torakalne tekočine. V 2.143 (62,8%) vzorcih smo dokazali

prisotnost specifičnih protiteles. V obravnavanem obdobju smo prisotnost virusa stekline dokazali pri 4 živalih, od tega pri treh lisicah in kuni. Z metodo določitve nukleotidnega zaporedja na genu za protein N smo določili, da izolata virusa stekline pri dveh lisicah, uplenjeni v letu 2012, in izolatu kune, uplenjene v letu 2014, pripadajo cepnemu virusu, klonu SAD B19. Z določanjem starosti smo pri lisicah ugotovili povezavo med starostjo lisic in prisotnostjo tetraciklina. Običajno so bile brez prisotnosti tetraciklina mlajše lisice, ki jih spomladansko cepljenje ni doseglo, uplenjene pa so bile pred jesenskim cepljenjem.

## Razprava

Organizacija in izvedba peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji poteka v skladu s priporočili Evropske komisije. Uspešnost ORV je določena na podlagi rezultatov aktivnega in pasivnega monitoringa prisotnosti virusa stekline v populaciji divjih živali, določanju stopnje odvzema vab in odstotka lisic, zaščitene pred infekcijo z virusom stekline. Pojavljanje stekline je takoj po začetku uvedbe cepljenja med divjimi živalmi drastično upadlo in se vse do leta 2011, ko je tudi sosednja Hrvaška pričela z vsesplošnim cepljenjem divjadi, ohranjalo v manjšem številu le na obmejnem področju. Stopnja odvzema vab presega 80% populacije, kar zagotavlja zaustavitev kroženja virusa znotraj populacije. Diskrepanco med odstotkom odvzema vab in odstotkom živali, pri katerih smo potrdili prisotnost specifičnih protiteles pripisujemo slabi kakovosti vzorcev, ki so lahko odvzeti tudi več dni po uplenitvi lisice. Naši rezultati so primerljivi z rezultati iz drugih držav. V našem prostoru se lisice rojevajo spomladi, v marcu in aprilu. Pomladansko polaganje vab se izvaja v mesecu maju, kar pomeni da v tistemletu rojene lisice ne pridejo v stik s cepivom, zaščitene pa so 3 do 5 mesecev preko maternalnih protiteles. Na osnovi tega lahko sklepamo, da je v obdobju od avgusta pa do jesenskega polaganja vab vsaj 2/3 lisičje populacije nezaščitene. Naši podatki o zaščiti zajemajo populacijo izven tega obdobja, ker uspešnost cepljenja spremljamo od oktobra pa do aprila naslednje leto. V obravnavanem obdobju smo v treh primerih ugotovili pri stekli živali cepni virus. Zadnje raziskave celotnega virusnega genoma v cepivih kažejo, da nekatera cepiva vsebujejo mešanico različnih virusnih sevov (4) Šele čas bo pokazal, kakšen vpliv na čas izkoreninjenja bolezn na nekem območju ima cepni virus, ki je sicer v redkih primerih patogen tudi za ciljne živali. Veliko držav je programe cepljenja uspešno zaključilo z varnejšim cepnim virusom SAG2. Bi morali tudi mi razmišljati v tej smeri?

## Reference

1. Baer GM, Abelseth MK, Debbie JG. Oral vaccination of foxes against rabies. *Am J Epidemiol.* 1971; 93 (6):487-90. PMID:4935086.
2. Anonyme. The oral vaccination of foxes against rabies: SCAHAW Report, European commission. pp 2-55.
3. Aubert MFA: Methods for the calculation of titres. In *Laboratory techniques in rabies*. Edt by Meslin F. WHO, Genova (1996), pp 291-300.
4. Cliquet F, Picard-Meyer E, Mojzis M, et al. In-Depth Characterization of Live Vaccines Used in Europe for Oral Rabies Vaccination of Wildlife. *PLoS One.* 2015; 10(10).

## **Evaluation on the efficiency of vaccination of foxes against rabies**

The eradication program of rabies in foxes using oral vaccination (ORV) method on whole territory of Slovenia has been carried out by Ministry for agriculture, forestry and food since 1995. The efficiency of ORV is validated on the basis of laboratory testing of foxes from vaccinated area. Results of virus detection, detection of biomarker and ages of foxes' yawls and specific antibodies against rabies virus are needed for good evaluation of ORV programme. Baits dropped by aircrafts were eaten by 72,1 % of foxes in 2011 and by 85,5 % foxes in 2015, respectively. Presented results confirmed that ORV of foxes in Slovenia against rabies was successful and characterized by steady increase of vaccine baits uptake and immunization of animals.

Key words: rabies; eradication; biomarker





vetkongres2016

# 6. Slovenski veterinarski kongres 6<sup>th</sup> Slovenian Veterinary Congress

Portorož, 2.-3. december 2016

Univerza  
*v Ljubljani* Veterinarska  
fakulteta



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO

UPRAVA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA VARNO HRANO,  
VETERINARSTVO IN VARSTVO RASTLIN