

NAUČNI SIMPOZIJUM „REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA“
SCIENTIFIC SYMPOSIUM „REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS
- Zbornik radova / Proceedings -

Organizatori / Organized by

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade

Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje
Department of reproduction, fertility and artificial insemination

Počasni predsednik / Honorary Chairmen

Prof. Dr Vlado Teodorović

Predsednik / Chairmen

Prof. Dr Vojislav Pavlović

Sekretar / Secretary

Prof. Dr Dragan Gvozdić

Organizacioni odbor / Organizing Committee

Prof. Dr Dragan Šefer, Prof. Dr Drago Nedić, Doc. Dr Milorad Mirilović,
Dr Spasoje Veselinović, Dr Dobrila Jakić-Dimić, Dr Stevan Perković,
Mr Zoran Debeljak, Zoran Marinković, vet. spec., Vladimir Špegar, vet. spec.,
Goran Jakovljević, vet. spec., Dubravko Vaić, vet. spec.

Naučni odbor / Scientific Committee

Prof. Dr Miloš Pavlović (predsednik), Prof. Dr Danijela Kirovski, Prof. Dr Slobodanka
Vakanjac, Prof. Dr Darko Gereš, Dr Milovan Jovičin, viši naučni saradnik

Sekretarijat / Secretariat

Prof. Dr Dragan Gvozdić, Maja Gabrić

Urednik / Editor

Doc. dr Milorad Mirilović

Izdavač

Naučna KMD, Beograd

Štampa

Naučna KMD, Beograd

Tiraž: 400 primeraka

Grafički dizajn i izrada korica

Doc. Dr Milorad Mirilović

SADRŽAJ

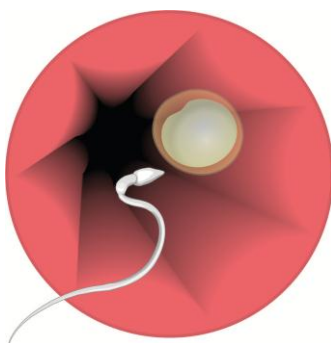
PLENARNI REFERATI

Szenci O., Szelényi Z., Karen A., Horváth A., Bajcsy Cs. Á.: ACCURACY OF TRANSRECTAL ULTRASONOGRAPHY AND PROGESTERONE TESTS FOR DIAGNOSIS OF NON-PREGNANCY AT DAY 21 AFTER INSEMINATION IN DAIRY COWS PRECIZNOST TRANSREKTALNE ULTRASONOGRAFIJE I PROGESTERONSKIH TESTOVA U DIJAGNOSTIKOVANJU NE-STEONOSTI 21 DAN NAKON INSEMINACIJE KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA.....	3
Gereš Darko, Špoljarić Branimira: ISPRAVKE NETOČNIH NAVODA <i>CORRECTION OF INACCURATE ALLEGATIONS</i>	39
Fratrić Natalija, Gvozdić Dragan: NEADEKVATAN TRANSFER PASIVNOG IMUNITETA KOD NOVOROĐENE TELADI <i>FAILURE OF PASSIVE TRANSFER OF IMMUNITY IN NEWBORN DAIRY REPLACEMENT CALVES</i>	57
Gvozdić Dragan, Fratrić Natalija: <i>MATERINSKO PREPOZNAVANJE GRAVIDITETA MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY</i>	69
Magaš Vladimir, Đurić Miloje, Maletić Milan: PROCENA MALIGNITETA TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KUJA <i>CLINICAL ASSESSMENT OF MALIGNANT TUMORS OF MAMMARY GLAND IN BITCHES</i>	81
Vakanjac Slobodanka, Pavlović Vojislav, Pavlović Miloš, Nedić Svetlana: PROCENA CITOLOŠKOG I MIKROBIOLOŠKOG KVALITETA DUBOKO ZAMRZNUTOG SEMENA BIKA <i>EVALUATION OF QUALITY CYTOLOGY AND MICROBIOLOGY BULL SEMEN</i>	91
Miloš Pavlović, Slobodanka Vakanjac, Svetlana Nedić: EGZOGENI UZROCI STERILITETA KOBILA <i>EXOGEN CAUSES OF INFERTILITY IN MARES</i>	101
Dovenski Toni, Trojačanec Plamen, Petkov Vladimir, Atanasov Branko: MANIPULACIJA ESTRALNIM CIKLUSOM KRAVA PRIMENOM RAZLIČITIH METODA SINHRONIZACIJE <i>MANIPULATION OF BOVINE ESTRUS CYCLE USING DIFFERENT SYNCHRONIZATION METHODS</i>	113

Grizelj Juraj, Ževrnja Branimira, Folnožić Ivan, Vince Silvijo: NEHORMONALNE METODE SINKRONIZACIJE ESTRUSA KOZA S PRIMJENOM UMJETNOG OSJEMENJIVANJA <i>NON-HORMONAL METHODS AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN DAIRY GOAT ESTROUS SYNCHRONIZATION</i>	125
RADIONICA	
Maletić Milan, Đurić Miloje, Magaš Vladimir: CARSKI REZ KRAVA I OVACA <i>CESAREAN SECTION OF COWS AND SHEEPS</i>	137
KRATKA SAOPŠTENJA I POSTERI	
Gereš Darko, Špoljarić Branimira: ZAVRŠETAK ANTIBIOTSKE ERE U LIJEČENJU <i>Staphylococcus aureus</i> MASTITISA U KRAVA <i>END OF ANTIBIOTIC ERA IN THE TREATMENT OF Staphylococcus aureus MASTITIS IN COW</i>	147
Milovanović Aleksandar, Barna Tomislav, Lazarević Miodrag, Ćupić Vitomir, Milovanović Branko: HORMONALNA INDUKCIJA LAKTACIJE KOD JUNICE - PRIKAZ SLUČAJA <i>ARTIFICIAL INDUCTION OF LACTATION IN HEIFER - CASE REPORT</i>	153
Došen Radoslav, Prodanov-Radulović Jasna, Pušić Ivan, Milanov Dubravka: IZNENADNA SMRT KRMAČA IZAZVANA KLOSTRIDIJALNIM INFEKCIJAMA <i>SUDDEN DEATH OF SOWS CAUSED BY CLOSTRIDIAL INFECTIONS</i>	155
Prka Igor: UTICAJ VELIČINE TESTISA BIKA NA PROIZVODNJU SPERME U CENTRIMA ZA VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE <i>THE INFLUENCE OF TESTICULAR SIZE OF BULL ON SPERM PRODUCTION IN ARTIFICIAL INSEMINATION CENTERS</i>	157
Jovičin Milovan, Kovačević Mira, Milovanović Aleksandar, Barna Tomislav, Dražić Mirko, Etinski Novak, Erdeljan Mihajlo: UPOTREBA RIGID KOLPOSKOPA U SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI REPRODUKTIVNIH STANJA POLNIH ORGANA KRAVA <i>USING OF RIGID COLPOSCOPE IN CONTEMPORARY DIAGNOSTICS OF THE REPRODUCTIVE HEALTH STATUS IN COWS</i>	165
Prodanov-Radulović Jasna, Došen Radoslav, Milanov Dubravka, Urošević Miroslav: ENDOMETRITIS KAO UZROK STERILITETA KRMAČA <i>ENDOMETRITIS AS A CAUSE OF SOWS STERILITY</i>	167

Radanović Oliver, Kureljušić Branislav, Jakić-Dimić Dobrila, Žutić Jadranka, Savić Božidar, Cvetojević Đorđe: IZOLACIJA HISTOPHILUS SOMNI IZ POSTELJICE KRAVE <i>ISOLATION OF HISTOPHILUS SOMNI FROM COW PLACENTA</i>	169
Čitaković Vladimir, Vakanjac Slobodanka, Maletić Milan, Đurić Miloje: UPOREDNO ISPITIVANJE RAZLIČITIH POSTUPAKA TERAPIJE HRONIČNIH ENDOMETRITISA NA TOK KLINIČKOG IZLEČENJA I PLODNOST KRAVA <i>COMPARATIVE STUDY ON DIFFERENT METHODS OF THERAPY OF CHRONIC ENDOMETRITIS THE CLINICAL COURSE HEALING AND FERTILITY IN COWS</i>	171
Vasiljević Teodora, Milovanović Aleksandar, Barna Tomislav, Lazarević Miodrag: UTICAJ STRUKTURE HRMATINA SPERMATOZOIDA NA OPRASIVOST I VELIČINU LEGLA <i>THE INFLUENCE OF SPERM CHROMATIN STRUCTURE ON BOARS' FERTILITY AND LITTER SIZE</i>	177
Cvetojević Đorđe, Kureljušić Branislav, Jezdimirović Nemanja, Radanović Oliver, Jakić-Dimić Dobrila, Veljović Ljubiša, Ivetić Vojin: PRIMENA PCR METODE U DIJAGNOSTICI POBAČAJA KOD GOVEDA IZAZVANIH SA <i>NEOSPORA CANINUM</i> <i>USAGE OF PCR IN DIAGNOSIS OF NEOSPORA CANINUM INDUCED ABORTIONS IN CATTLE</i>	179
Nedić Svetlana, Vakanjac Slobodanka, Đurić Miloje, Maletić Milan: MIKROBIOLOŠKA ANALIZA TEČNOG AZOTA IZ KONTEJNERA ZA SKLADIŠTENJE DUBOKO ZAMRZNUTOG SEMENA BIKOVA <i>MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF LIQUID NITROGEN CONTAINERS FOR STORAGE OF BOVINE FROZEN SEMEN</i>	181
INDEKS AUTORA	187

PLENARNI REFERATI



ACCURACY OF TRANSRECTAL ULTRASONOGRAPHY AND PROGESTERONE TESTS FOR DIAGNOSIS OF NON-PREGNANCY AT DAY 21 AFTER INSEMINATION IN DAIRY COWS

**Szenci O.^{1,2}, Szelényi Z.^{1,2}, Karen A.¹, Horváth A.^{1,2},
Bajcsy Cs. Á.^{1,2}**

*¹Department and Clinic of Food Animals, Faculty of Veterinary Science,
Szent István University, H-2225 Üllő – Dóra major, Hungary*

*²HAS-SZIU Large Animal Clinical Research Group,
H-2225 Üllő – Dóra major, Hungary*

An optimum interval from calving to conception of 85 to 115 days requires intensive management activities during the first 100 days after calving. Early postpartum breeding in dairy cows results in more calves and higher milk production per lactation, but early bred cows require more inseminations and have a greater occurrence of embryonic mortality (Britt, 1975). Poor reproductive performance can reduce the number of calves born and milk production and may increase the cost of therapy and semen.

Accurate detection of pregnant and non-pregnant cows as well as pregnancy loss plays a key role in achieving an optimum calving to conception interval. Recently, it was demonstrated that pregnancy testing by means of transrectal palpation or ultrasonography after Day 30 can result in shorter calving intervals (Thompson et al., 1995; Baxter and Ward, 1997), however early palpation of the uterus may be associated with a reduced calving rate (Thompson et al., 1994).

EVALUATION OF PREGNANCY DIAGNOSES

The reliability of the diagnostic method and the accuracy of the diagnosis can be evaluated by using a 2x2 table (Table 1), for which data are obtained for all cells (Smith, 1991). Two parameters are traditionally used to describe the characteristics of a particular diagnostic method. The sensitivity (Se) can be defined as the likelihood of a positive test result in cows known to have calved. An equation describing the sensitivity is $a/(a+d) \times 100$.

Conversely, the specificity (Sp) is defined as the likelihood of a negative test result in cows known to be non-pregnant and is given by the equation $c/(c+b) \times 100$. Although the sensitivity and specificity of the diagnostic method are important, practitioners should be more concerned with the predictive value of the diagnostic method, i.e. the probability that the diagnosis accurately reflects

the true pregnancy status. The positive predictive value (+PV) is the probability of the presence of pregnancy in an animal diagnosed as pregnant, i.e. $a/(a+b) \times 100$. The negative predictive value (-PV) is the probability of the absence of a pregnancy in animal diagnosed as not pregnant, i.e. $c/(c+d) \times 100$ (Hanzen et al., 2000).

Table 1. Outcome of diagnostic tests by Smith (1991)

Diagnosis	Pregnant	Non-pregnant
Pregnant	a (correct positive)	b (incorrect positive)
Non-pregnant	d (incorrect negative)	c (correct negative)

PREGNANCY TESTING IN COWS

Palpation per rectum for pregnancy diagnosis in cows

For many years, rectal palpation of the uterus has been the accepted method for diagnosis of early pregnancy in cattle. Depending upon the skill of the examiner, rectal palpation diagnoses pregnancy from day 30 after AI, and can be utilized thereafter until term. In a recent study, the sensitivity and specificity of rectal palpation was 98.8% and 87%, when the diagnosis was made between days 37 and 43 after AI, respectively (Warnick et al., 1995).

The main advantage of this method is that it is simple and cost-effective because the skilled and experienced operator requires only disposable plastic sleeves. To avoid rectal irritation, the operator may use a disposable latex exam glove over the sleeve. A further advantage is that the method provides an immediate diagnosis, and non-pregnant cows can be treated immediately in order to shorten the calving interval (Arthur et al., 1996).

There are three methods frequently used for rectal palpation:

Palpation of the uterine fluctuation - From days 30 to 35 of gestation, disparity in uterine horn size (due to the presence of allantoic fluid which give the uterine horn a fluctuating feel with good tone) is strong evidence of pregnancy (Abbitt et al., 1978). Several other conditions such as pyometra, mucometra, hydrometra and poor postpartum uterine involution can cause similar differences (Arthur et al., 1996). Age and parity of the cow may also influence the size of the uterine horn. Bilateral twin pregnancy may also result in the enlargement of both uterine horns with a corpus luteum graviditatis in each ovary.

Palpation of the allantochorion (foetal membrane slip) - From days 35 to 40 (up to day 95) of gestation the allantochorion membrane can be palpated using the membrane slip technique. After locating the bifurcation of the uterine horns, the enlarged gravid uterine horn is picked up between thumb and middle finger, just cranial to the bifurcation, and the whole thickness of the horn may be

gently squeezed. The allantochorion can be eventually identified as a very fine structure as it slips between the fingers. From day 60 of gestation, the examination of the non-gravid uterine horn is recommended because the allantochorion membrane can be felt more easily (Abbitt et al., 1978).

Palpation of the amniotic vesicle - The amniotic vesicle is palpable from day 28 in heifers and from days 32 to 35 in pluriparous cows after service until approximately day 65 of pregnancy. The palpation of amniotic vesicle is similar to that of allantochorion. The uncoiled horn can be gently palpated along the entire length between the fingers. The amniotic sac can be felt as a spherical, turgid, fluid-filled structure 1-2 cm in diameter floating in the allantoic fluid. It is most commonly found at the cranial edge of the intercornual ligament. The vesicle should not be compressed directly but gently pushed backwards and forwards (Abbitt et al., 1978).

According to White et al. (1989a), the optimal time for pregnancy diagnosis using rectal palpation is between days 51 and 56 after AI or service. The mean calving interval was significantly lower in these cows (369 days), in comparison with those examined between days 30 and 50 (377 days) or after day 57 (378 days). In addition, cows diagnosed pregnant before day 41 after AI, were significantly less likely to have a calf than cows diagnosed later (White et al., 1989b). Similarly cows diagnosed pregnant from days 30 to 36 post breeding, had a 2-week longer calving interval in comparison with cows palpated at later intervals (Warnick et al., 1995).

The greatest disadvantage of this method is that rectal manipulation of the uterus (palpation of uterine fluctuation, palpation of the foetal membrane slip or palpation of the amniotic vesicle) may increase the risk of embryonic death. Abbitt et al. (1978) reported that palpation for fluctuation alone in cows pregnant from 35 to 70 days was an accurate and safe method to diagnose pregnancy, but using the membrane slip technique or, to a lesser degree, the amniotic vesicle palpation technique resulted in increased foetal loss. The significant iatrogenic cause of foetal death was also confirmed (Abbitt et al., 1978; Franco et al., 1987; White et al., 1989b; Thurmond and Picanso, 1993). However, other research has not been able to confirm the iatrogenic effect of rectal palpation (Paisley et al., 1978; Vaillancourt et al., 1979). Recently, the effect of the membrane slip technique on foetal loss has been controlled by a non-invasive method (PSPB RIA test, conceptus proteins). No significant difference was found between the control and the palpated group therefore, embryonic mortality was not caused by rectal palpation. However, it was not possible to separate embryonic mortality caused by rectal palpation from spontaneous embryonic loss that may also occur in non-palpated cows (Alexander et al., 1995). Similarly, no iatrogenic effect of the membrane slip technique using once or twice were reported (Romano et al., 2007 and 2011), however inexperience in

rectal palpation may contribute to higher pregnancy loss (Richardson et al., 2010).

The role of rectal palpation in transmission of other infectious diseases is unknown (Youngquist, 1997). However, it may cause bacteraemia in some cows (Stem et al., 1984), therefore the examiner should be aware that rectal palpation is not without consequences (Youngquist, 1997). There is a lack of evidence of transmission of bovine leukaemia virus (BLV) by routine rectal palpation of dairy cows (Lassauzet et al., 1989). However, in herds in which other measures to control transmission of BLV are practised, it may be important to use a separate clean obstetric sleeve for palpation of each cow (Youngquist, 1997).

Ultrasonography for pregnancy diagnosis in the cow

Ultrasound technology was originally transferred from human to veterinary practice, and the available transducers and scanner determined the species and mode of examination. In the 1970s, A-mode (amplitude-depth analyser) and Doppler ultrasound (detecting foetal heart and blood flow in the umbilical arteries) became common practice. However, these techniques did not improve on-farm pregnancy diagnoses (Barlett and Sorensen, 1980; Noakes, 1985; McCaughey and Gilmore, 1990; Cameron and Malmo, 1993). The development of real-time B-mode ultrasonography and the high frequency transducers has encouraged wide use of ultrasonography in commercial farms. High frequency produces a higher resolution image, but also reduces the penetration of ultrasound, and reduces the depth at which images may be obtained.

In ultrasonographic examination, a cow is considered to be pregnant when an irregularly shaped, non-echogenic black spot (or spots) are recognised within the uterine lumen, representing the allantoic fluid. The demonstration of embryonic membranes (Nation et al., 2003) or/and an embryo (Szenci et al., 1998a) provides additional confirmation of pregnancy (Table 2). Where no such signs are found the possibility of pregnancy is ruled out, giving a non-pregnant diagnosis. The confirmation of ultrasonic diagnoses is usually based on palpation per rectum of the uterus at 2 to 3 months after AI, or upon spontaneous return to oestrus after AI. A cow is also considered pregnant if an embryo proper with a beating heart is recognised at a final ultrasonic examination on Days 50 to 60 after AI. Cows diagnosed as non-pregnant by palpation per rectum or by ultrasonography between Days 50 to 90 are usually designated as non-pregnant (Taverne et al., 1985; Curran et al., 1986a, 1986b).

Table 2. Characteristics identified using ultrasonography for pregnancy diagnosis, indicating first day of detection

Characteristic	First day detected (<i>*Curran et al., 1986a, 1986b; Curran and Ginther, 1991</i>)	First day detected (<i>Totey et al., 1991</i>)
Embryo proper	19 to 24	19.5±0.7
Heartbeat	19 to 24	22.6±0.9
Allantois	22 to 25	23.1±0.8
Spinal cord	26 to 33	33.0±1.5
Forelimb buds	28 to 31	32.7±1.3
Amnion	28 to 33	25.1±1.4
Eye orbit	29 to 33	33.6±1.4
Hind limb buds	30 to 33	32.9±1.3
Placentomes	33 to 38	35.2*
Split hooves	42 to 49	44.6*
Foetal movement	42 to 50	50.7±1.30
Ribs	51 to 55	60.9±1.7
Sex of the foetus	50 to 100	

Due to the fact that the first ultrasonographic scanners used in the veterinary practice originated from the human practice and they were equipped with a 3.0 or 3.5 MHz linear-array or sector transducer, therefore the accuracy of these transducers were firstly investigated (Taverne et al., 1985; Chaffaux et al., 1986; Hanzen and Delsaux, 1987). Under field conditions acceptable results (sensitivity 77.7-100%, specificity 78.7-92.3%) in cattle could only be achieved from Day 36 after service. Therefore, the low frequency (3.0 or 3.5 MHz) transducer did not give an advantage over rectal palpation and biochemical methods of pregnancy diagnosis in cattle, because these techniques were unable to diagnose pregnancy accurately before Day 40 after A.I.

Transrectal real-time B-mode ultrasonography of the uterus, using a 5.0 MHz linear-array or sector transducer (Table 3), is a highly accurate method for selecting pregnant and non-pregnant cattle from as early as Days 25 to 26 after AI. Field studies reported that 2 to 5% of the calving animals were incorrectly diagnosed as non-pregnant, and 8.7 to 36% of the non-calving cows were incorrectly diagnosed as pregnant (Pieterse et al., 1990; Szenci et al., 1990; Hanzen and Laurent, 1991). However, according to Badtram et al. (1991), the sensitivity and specificity of the ultrasound test between Days 23 and 31 after insemination were only 68.8% and 71.7%, respectively. In a recent study, maximum sensitivity and negative predictive value were reached at Day 26 in heifers and at Day 29 in cows (Romano et al., 2006).

Table 3. The accuracy of ultrasonography for the diagnosis of pregnancy in cattle using a 5.0 MHz linear-array or sector (2) transducer

Reference	Days after A.I.	A (n)	b (n)	c (n)	d (n)	Se (%)	Sp (%)	+PV (%)	-PV (%)
1	21-25	13	6	28	16	44.8	82.3	68.4	63.6
	26-33	43	5	36	1	97.7	87.8	89.6	97.2
2	17-24	17	5	30	34	33	86	77	47
	25-29	54	4	42	1	98	91.3	93	97.6
	30-39	87	0	56	0	100	100	100	100
3	16-31	80	35	107	77	51.0	75.4	69.6	58.2
	23-31	NG	NG	NG	NG	68.8	71.7	71.1	ND
4	<30	42	6	7	2	95	54	88	78
	30-39	502	63	132	25	95	67	89	84
	40-49	444	39	129	8	98	77	92	94
5	22-40	NG	NG	NG	NG	96.2	71.1	89.6	87.8
6 (Dairy cows)	25-28	187	24	405	11	94.4	94.4	88.6	94.4
	29	42	4	105	0	100	96.3	91.3	100
	30	34	3	114	0	100	97.4	91.9	100
6 (Dairy heifers)	24-25	48	5	57	3	94.1	91.9	90.6	95
	26	17	1	30	0	100	96.7	94.4	100
	27	25	2	26	0	100	92.8	92.6	100

NG: not given

1. Pieterse et al., 1990
2. Szenci et al., 1990
3. Badtram et al., 1991
4. Hanzen and Laurent, 1991
5. Filteau and DesCoteaux, 1998 (n=435)
6. Romano et al., 2006

Under controlled experimental conditions, the accuracy of a 5.0 MHz linear-array transducer for early pregnancy diagnosis in heifers was very low (<64.2%) up to Day 16 after breeding, but the accuracy increased after Day 18 and was 100% by Day 20. In these experiments, non-bred heifers were used for the diagnosis of non-pregnancy (Kastelic et al., 1988, 1989). Similar results could not be obtained in field studies.

Transrectal real-time B-mode ultrasonography of the uterus, using a 7.5 MHz linear-array transducer (Table 4), provides a method with an accuracy of more than 90% to select pregnant (sensitivity 90.4%) and non-pregnant cattle (specificity 96.0%) from Day 29 or 30 onwards (Szenci et al., 1998a). When the recognition of an embryo proper with a beating heart was used as the criterion

for a positive ultrasonographic pregnancy diagnosis, significantly ($P < 0.001$) more false negative and less false positive ultrasound diagnoses were made, in comparison with recognition of allantoic fluid. With the exception of one false positive diagnosis and two false negative diagnoses from Day 33 after AI, no errors were made in distinguishing pregnant cows from non-pregnant cows, when the recognition of allantoic fluid was used as the criterion for pregnancy diagnosis (Szenci et al., 1998a).

Table 4. The accuracy of ultrasonography for the diagnosis of pregnancy in cattle using a 7.5 MHz linear-array transducer

Reference	Days after A.I.	a (n)	b (n)	c (n)	d (n)	Se (%)	Sp (%)	+PV (%)	-PV (%)
1 ^a	26-27	29	1	73	35	45.3	98.6	96.6	67.5
	29-30	48	1	74	15	76.1	97.9	97.9	83.1
	33-34	54	0	75	6	90.0	100	100	92.5
1 ^b	26-27	53	4	70	11	82.8	94.5	92.9	86.4
	29-30	57	3	72	6	90.4	96.0	95.0	92.3
	33-34	58	1	74	2	96.6	98.6	98.3	97.3
2	27-31	28	0	22	6	82.3	100	100	78.5
	34-38	31	0	20	0	100	100	100	100

^aRecognition of an embryo proper with a beating heart was used as the criterion for positive pregnancy diagnosis

^bRecognition of allantoic fluid was used as the criterion for positive pregnancy diagnosis

1. Szenci et al., 1998a
2. Szenci et al., 1998b

Under controlled experimental conditions, the accuracy of a 7.5 MHz linear-array transducer (Table 6) for early pregnancy diagnosis was very low (sensitivity 40%, specificity 66.6%) between Days 11 to 16 after breeding, but the accuracy increased markedly after Day 17 and was 100% by Day 20 (Boyd et al., 1990). Similar results were reported by Kastelic et al. (1991a), however pregnancy diagnosis at such an early stage could be confounded by the presence of the intrauterine luminal fluid therefore similar results could not be reached in the practice.

Under field conditions, acceptable results may be achieved with ultrasonography (using 5 or 7.5 MHz transducers) from Days 25 to 30 after AI (Hanzen and Laurent, 1991; Pieterse et al., 1990; Szenci et al., 1990; Szenci et al., 1998a,b). The reliability of the test greatly depends on the frequency of the transducer used, the skill of the operator (Badtram et al., 1991), the criterion

used for a positive pregnancy diagnosis (Szenci et al., 1998a) and the position of the uterus in the pelvic inlet (Szenci et al., 1995). More incorrect non-pregnancy diagnoses were made in cows between Days 24 to 38 in which the uterus was located far cranial to the pelvic inlet, in comparison with cows in which the uterus was located within or close to the pelvic inlet (Szenci et al., 1995).

Chemical tests for pregnancy diagnosis in cows

Progesterone assays

Progesterone production by the corpus luteum graviditatis plays an essential role in the establishment and maintenance of pregnancy. Because of the elevated progesterone concentrations on days 20 to 24 after AI, an assay for measuring the progesterone concentrations in blood or milk has been proposed as a pregnancy test in farm animals (Robertson and Sarda, 1971). Progesterone can be measured by radioimmunoassay (RIA), and enzymimmunoassay (EIA) in laboratories and by various assay kits that are available for on-farm use. Several kits for on-farm pregnancy determination entered the market in 1985, when the first on-farm P4 test became commercially available (Nebel, 1985). The advantage of using cow-side tests is that it is possible to get an immediate result on site, and it does not require expensive laboratory facilities and hazardous radioisotopes. The developments of EIA assays solve the problem of using radioisotopes, however the process is still time-consuming.

Since progesterone is a fat-soluble hormone, it is concentrated in milk at levels 2 to 8 times as high as circulating plasma levels. Because handling of a sample can negatively affect the concentration of progesterone in the plasma or milk, it is important to separate immediately plasma from blood cells. Before delivery to a laboratory, milk samples should be frozen or chemically preserved with potassium dichromate (2 mg) (BonDurant, 1986), or a tablet containing potassium dichromate and mercuric chloride (Arthur et al., 1996). It is also very important not to expose the sample to high temperature or excessive ultraviolet light. Although the measurement of the progesterone concentration in the plasma is a perfectly valid and reliable laboratory method, the collection of a blood sample by a veterinary surgeon limits its use in the field (Arthur et al., 1996). During afternoon milking, higher fat content milk samples can be easily collected into plastic or glass tubes by the herdsman on the farm.

The progesterone test is not specific for the presence of a live conceptus in the uterus (Humboldt et al., 1988a), because it only indicates the presence of a corpus luteum, which may not invariably be associated with the presence of a conceptus. Cows are considered to be pregnant in the progesterone test if they do not return to oestrus and their progesterone concentrations are elevated on days 20 to 24 after AI. Conversely, cows are assumed to be non-pregnant when their progesterone concentrations are low at days 20 to 24 after AI. For a single

sample procedure, it is advisable to collect milk on day 24 in order to decrease the sample of those cows with return to oestrus before that time (Heap et al., 1976).

Measurement of the progesterone concentration in plasma or milk has been found to be 75 to 85% accurate (Arthur et al., 1996) in correctly identifying pregnant cows and nearly 100% accurate in identifying non-pregnant cows (Youngquist, 1997). Results with sensitivity 67.2% and specificity 98.1% were reported when plasma P4 measurements were performed on day 24 after AI (Humblot et al., 1988a). In contrast, on the basis of day 0 and day 21 samples a relatively low accuracy (specificity of milk RIA test, 47.5%) was reported for the diagnosis of non-pregnant cows. At the same time, the sensitivity of the milk RIA test was 86.2% (Pieterse et al., 1990). Eight different commercial progesterone test kits were compared by Nebel et al. (1989), and the sensitivity of the tests ranged between 75 and 86% while the specificity of the tests ranged between 89 and 99%, respectively. In contrast with these findings, Pieterse et al. (1990) reported a relatively high accuracy (sensitivity 93.1%) for diagnosing calving cows, and a very low accuracy (specificity 39.3%) for diagnosing non-calving cows by using the Ovucheck EIA test kit. The concentration of fat in milk, or an interaction of milk fat and day of cycle may influence test results.

The advantage of a progesterone test, especially if an on-farm test is used on day 24 after AI, is that the non-pregnant cows can be detected at a much earlier stage, in comparison with other methods. The disadvantage of this method is that the measurement of progesterone level is not specific for pregnancy. The elevated progesterone concentration around days 20 to 24 after AI only indicates the presence of a corpus luteum, which may be associated with a conceptus, uterine abnormalities (pyometra), embryonic death, shorter or longer oestrus cycles, ovarian abnormalities (follicular luteal cyst) or incorrect timing of insemination.

Depending on the incidence rate of these factors, the false positive results can change accordingly. Errors may negatively affect the occurrence of false positive diagnosis, and can also increase the number of false negative diagnoses by inadequate mixing of milk (low fat sample), failure in milk storage or low progesterone production of the corpus luteum. The milk progesterone test is cost effective, especially when used for the early identification of non-pregnant dairy cows and followed by rectal palpation to confirm pregnancy at 6 to 8 weeks after AI (Booth, 1987). Using three individual samples collected at weekly intervals from day 35 to 49, may increase the accuracy of diagnosing pregnant and non-pregnant cows (Barth et al., 1989). Similarly, two or three samples collecting between days 20 and 24 after AI, may increase the accuracy of the progesterone test. However, the cost of testing and the wide variation in the accuracy of pregnancy diagnoses may limit the wide use of the progesterone test in the practice.

The on-farm milk progesterone test is recommended to assess the accuracy of oestrus detection. Due to errors in detecting oestrus on the farm, up to 20% of the cows are inseminated during the luteal phase. Therefore, identifying these cattle by measuring the progesterone concentration before AI is of great importance (Szenci et al., 2010). However, a single low progesterone concentration does not necessarily mean that the cow is in oestrus. The presence of a turgid, coiled uterus, and a mucus vaginal discharge should also be considered (Arthur et al., 1996).

With the latest developments in immunosensors, automated real-time measuring of progesterone concentrations on a daily basis in the milking parlour is also available (Van der Lende et al., 1992; Claycomb et al., 1995; Delwiche et al., 2001; Käppel et al., 2007). During milking, diagnosis of subfertility in the postpartum dairy cows by measuring milk progesterone concentrations (Gordon, 1996) or selecting dairy cows in estrus (Delwiche et al., 2001) is of great value.

Conceptus proteins (PSPB, PAG)

Trophoblastic mono- and binucleate cells from the early bovine conceptus synthesize substantial amounts of proteins. Among these, one has been described as bovine pregnancy specific protein B (bPSPB) which enters into the maternal circulation (Butler et al., 1982). In addition, a bPSPB related protein, designated bovine pregnancy associated glycoprotein (bPAG; Zoli et al., 1991) or bPAG1 (Xie et al., 1991) has been described. Bovine PSPB (Sasser et al., 1986) and bPAG1 (Xie et al., 1991) are inactive aspartic acid proteinases, and are identical in genetic nucleotide sequence (Lynch et al., 1992; Vasquez et al., 1995; Xie et al., 1995). The isolated preparations of bPSPB and bPAG1 may differ in carbohydrate and sialic acid content, which may explain the minor differences in profile and disappearance from maternal circulation after calving or EM (Szenci et al., 1998a; Beckers et al., 1998, 1999). Because both bPSPB and bPAG1 are found in the maternal circulation during pregnancy, these proteins are good indicators of the presence of a live embryo. Both bPSPB and bPAG1 have been detected in the serum of some pregnant cows as early as Days 15 to 22 (Sasser et al., 1986; Zoli et al., 1992) or Day 22 (Giordano et al., 2012) after AI.

Due to delayed appearance of these proteins in the blood in some cows, the use of these proteins for PD provides more accurate results when used from Days 28 to 30 onwards (Humblot et al., 1988c; Szenci et al., 1988a,b; Vasquez et al., 1995). Both bPSPB and bPAG1 have been detected in peripheral circulation during the postpartum period 70 to 100 days after calving (Zoli et al., 1992; Kirakofe et al., 1993). In a recent study, 56.7 and 44.9% of the false positive diagnoses based on bPSPB and bPAG1 tests, respectively, originated from cows that were inseminated within 70 days after calving (Szenci et al., 1998a). These findings indicate that the presence of bPSPB and bPAG1 in the plasma of cows during early stages of the postpartum period may limit their use under field

conditions. If only these cows are selected for the protein tests which are inseminated after Day 50 (Sasser et al., 1991) or Day 70 (Ruder and Sasser, 1986; Humblot et al., 1988a,b), post calving interference with the residual bPSPB and bPAG1 in the peripheral circulation during the postpartum period can be minimal. A further limitation is that after LEM, protein levels may remain above the threshold level, although the concentration of both proteins decreases steadily (Semambo et al., 1992; Szenci et al., 2000). This is probably related to the relatively long half-life (7-8 days for bPSPB and 3-4 days for bPAG1) in the maternal circulation after EM (Semambo et al., 1992; Szenci et al., 2003). Further limitations of the blood protein tests using RIA (Sasser et al., 1991; Zoli et al., 1992) or ELISA tests (Green et al., 2005; Breed et al., 2009; Piechotta et al., 2011) are stringent quality control procedures during sample processing from collection to the return of pregnancy diagnosis to the farm and a minimum turn out time around of 2 to 3 days. To overcome the above mentioned limitations milk ELISA tests have been recently developed (Friedrich and Holtz, 2010; Byrem et al., 2012; LeBlanc, 2013), however the development of an on-farm test would be the real solution for the farm.

Early pregnancy factor

The earliest specific indication for fertilization and the continuing presence of a viable conceptus is a serum constituent, which was originally detected in mice (Morton et al., 1974). This substance is known as the early pregnancy factor (EPF) and has also been described in women (Morton et al., 1977), sheep (Morton et al., 1979), cattle (Nancarrow et al., 1981) and pigs (Paisley et al., 1982).

The reported and extraordinary properties of EPF include:

- Early appearance (within hours) after mating or insemination (Morton et al., 1977)
- Rapid disappearance following induced death or removal of the embryos (Rolfe et al., 1984; Yamazaki et al., 1995)

These factors suggest that EPF may be the most useful tool for investigating early embryonic survival or failure (Rolfe, 1982; Koch, 1986; Yamazaki et al., 1995). At present, the detection of early pregnancy factor is entirely dependent on the use of the rosette inhibition test (RIT). This test is based on the ability of anti-lymphocyte serum (ALS) to inhibit the formation of spontaneous rosettes between T-lymphocytes and heterologous red blood cells. This means that the lymphocytes spontaneously form rosettes, a flower-like arrangement in which a lymphocyte has several red blood cells attached to it. Lymphocytes from pregnant animals form fewer rosettes than those from non-pregnant animals.

An improvement of the rosette inhibition test for the detection of EPF was achieved using monoclonal antibodies instead of anti-lymphocyte serum (Yoshioka et al., 1995). The rosette inhibition test is very time-consuming and depends on many factors, and so crossed immunoelectrophoresis (CIE) was developed as an alternative method (Klima et al., 1987). Conducting CIE and interpretation of the results is superior in comparison to RIT, however the accuracy of the test is similar to RIT (Klima et al., 1987). Recent results suggest that EPF is a common 12 kDa protein, thioredoxin (Clarke, 1992) or an EPF-like substance 21-30 kDa (Ito et al., 1994). These proteins are elevated in the circulation of pregnant dams and are able to increase rosette inhibition titres (Clarke, 1992; Ito et al., 1994). However, Klima et al. (1992) suggest that bovine EPF activity may reside in a 67 kDa polypeptide with an unknown relationship to thioredoxin. Further studies are needed to confirm these studies. Recently, an ELISA assay has been developed for detection of a glycoprotein immunosuppressive EPF of 20 kDa in the serum of pregnant cows. The assay was able to diagnose pregnancy in 87.5% of cows less than 24 hours after gestation, with a visible colour change. Non-pregnant cows were also identified with 87.5% accuracy (Threlfall, 1994).

Although, EPF has been described in food animals, technical limitations with the rosette inhibition test have hindered its validation and widespread adoption. This test in its present form is not practical for routine pregnancy diagnosis, and newly developed ELISA tests may solve this problem (Threlfall, 1994).

A new diagnostic test, the early conceptus factor (ECF) test, has been developed recently for the field (Cordoba et al., 2001, Gandy et al., 2001). However, the current ECF test cannot accurately identify conception or conception failure within days or any time before Day 21 after A.I.

DIAGNOSIS OF NON-PREGNANCY AT DAY 21 AFTER INSEMINATION IN COWS

Accurate selection of non-pregnant cows at Day 21 after AI will enable the producer to re-inseminate or treat them when necessary. Accurate detection of nonpregnancy requires a test with high sensitivity and negative predictive value (Romano et al., 2006), whereas the number of false negative diagnoses (pregnant cows diagnosed by the test as nonpregnant) is nil or minimum. Therefore, there is no risk for abortion if the treatment is recommended for correctly diagnosed non-pregnant cows.

In a recent study, some non-pregnant cows could already be recognised by the absence of a corpus luteum at the first ultrasonographic examination on Day 20 or 21 after AI. With the exception of one cow, every non-pregnant cow was correctly diagnosed by Day 29 or 30 (Szenci et al., 1999). In a recent study, the accuracy of transrectal ultrasonography (TRU) and four milk progesterone (P4) tests for selecting non-pregnant cows at Day 21 after AI in dairy cows was

evaluated (Karen et al., 2012). It was reported that the TRU and quantitative and semi-quantitative milk P4 assays might be better than the qualitative rapid milk P4 assay for predicting the non-pregnant cows at Day 21 after AI. Cows which have no CL, CL < 2 cm in diameter or low P4 concentration at Day 21 (represented half of non-pregnant cows in the study) might be accurately predicted as non-pregnant by TRU and quantitative and semi-quantitative P4 tests. At the same time Fricke et al. (2003) found some limitations of integrating early pregnancy diagnosis (Day 26 vs. Day 33) into a resynchronization program because the overall pregnancy rate per AI to Resynch was greater for D26 and D33 cows than for D19 cows (Resynch was started on D19, D 26 or D33 with GnRH treatment, respectively).

CONCLUSIONS

The present review was undertaken to summarize the results achieving by different methods for the diagnosis of early pregnancy in the cow. The advantage and disadvantage of the different methods are discussed.

Although transrectal palpation of the uterus for pregnancy diagnosis in dairy cattle is the oldest and most widely used direct method today, transrectal ultrasonography performed by portable and reliable ultrasound scanners with price for all may replace transrectal palpation as the primary method used for pregnancy diagnosis in the field in the near future. Pregnancy protein assays (PAG, PSPB) may provide an alternative method to ultrasonography for determining early pregnancy in the cow. Incidence rate of pregnancy losses (late embryonic / early fetal mortality) may limit the effectiveness of many indirect methods for early pregnancy diagnosis in the field, especially when compared with direct methods such as transrectal palpation or transrectal ultrasonography. To improve reproductive performance further developments are needed to overcome the above mentioned limitations.

References:

1. *Abbitt B, Ball L, Kitto GP, Sitzman CG, Wilgenburg B, Raim LW, Seidel GE.* 1978 Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and foetal mortality and foetal attrition in cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*,173.973-977.
2. *Alexander BM, Johnson MS, Guardia RO, Van de Graaf WL, Senger PL, Sasser RG.* 1995 Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology*.43.551-556.
3. *Arbeiter K, Holler W.* 1980 Control of birth about the influence of partus, puerperium and rate of conception following injection of flumethasone/dexamethasone (corticoids) and planipart (B-adrenergic agent) in cattle. *Deutsche Tierarzliche Wochenschrift*.87.249-251.

4. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ. 1996. Pregnancy and its diagnosis. In: Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, eds., Veterinary reproduction and obstetrics. London, UK: WB Saunders Company Ltd, pp. 63-109.
5. Badtram GA, Gaines JD, Thomas CB, Bosu WTK 1991. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. Theriogenology.35.1153-1167.
6. Barth T, Kiessling J, Leker L. 1989. Pregnancy diagnosis in cows by triple determination of milk progesterone. Monatshefte für Veterinärmedizin.44.632-635.
7. Bartlett DC, Sorensen AM. 1980 Pregnancy detection in the bovine by ultrasonics. Journal of Animal Science,57 (Suppl. 1).18.
8. Baxter SJ, Ward WR. 1997 Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. Veterinary Record.140.287-288.
9. Beckers JF, Drion PV, Garbayo JM, Perényi ZS, Zarrouk A, Sulon J, Remy B, Szenci O. 1999 Pregnancy associated glycoproteins in ruminants: inactive members of the aspartic proteinase family. Acta Veterinaria Hungarica. 47.461-469.
10. Beckers JF, Zarrouk A, Batalha ES, Garbayo JM, Mester L, Szenci O, 1998. Endocrinology of pregnancy: Chorionic Somatomammotropins and Pregnancy-Associated Glycoproteins: Review. Acta Veterinaria Hungarica.46.175-189.
11. BonDurant RH. 1986 Examination of the reproductive tract of the cow and heifer. In: Morrow DA, ed. Current therapy in theriogenology. Philadelphia, USA: W.B. Saunders. pp. 95-101.
12. Booth JM. 1987. Pregnancy testing today. British Veterinary Journal.143.385-386.
13. Boyd JS, Omran SN, Ayliffe TR. 1990 Evaluation of real-time B-mode ultrasound scanning for detecting early pregnancy in cows. Veterinary Record.127.350-352.
14. Breed MW, Guard CL, White ME, Smith MC, Warnick LD. 2009. Comparison of pregnancy diagnosis in dairy cattle by use of a commercial ELISA and palpation per rectum. Journal of American Veterinary Medicine Association.235.292-298.
15. Britt JH. 1975. Early postpartum breeding in dairy cows. A review. Journal of Dairy Science.58.266-271.
16. Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, Williams RJ. 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. Biology of Reproduction.26.925-933.
17. Byrem TM, Velek K, Pearse HL. The detection of pregnancy associated glycoproteins (PAG) in routine milk recording samples as an indicator of

- pregnancy in dairy cattle. <http://www.icar.org/Cork 2012/Manuscripts/Published/Byrem.pdf>
18. *Cameron AR, Malmo J.* 1993. Evaluation of an ultrasonic Doppler probe for pregnancy diagnosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*.70.109-111.
 19. *Chaffaux S, Reddy GNS, Valon F, Thibier M.* 1986. Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosing pregnancy and for monitoring embryonic mortality in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*.10.193-200.
 20. *Clarke FM.* 1992. Identification of molecules and mechanisms involved in the 'early pregnancy factor' system. Symposium on growth factors in early embryonic development, University of Sydney, Australia. *Reproduction, Fertility and Development*.4.423-433.
 21. *Claycomb R, Delwiche M, Munro C, Bondurant R.* 1995. Rapid enzyme linked immunosorbent assay for on-line measurement of bovine progesterone during milking. *Biology of Reproduction*.52.107.(Abstr.)
 22. *Cordoba MC, Sartori R, Fricke PM.* 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.84.1884-1889.
 23. *Curran S, Pierson RA, Ginther OJ.* 1986a. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *Journal of American Veterinary Medicine Association*.189.1289-1294.
 24. *Curran S, Pierson RA, Ginther OJ.* 1986b. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *Journal of American Veterinary Medicine Association*.189.1295-1302.
 25. *Curran S, Ginther OJ.* 1991. Ultrasonic foetal determination of foetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology*.36.809-814.
 26. *Delwiche M, Tang X, BonDurant R, Munro C.* 2001. Estrus detection with a progesterone biosensor. *American Society of Agricultural Engineers*.44.2003-2008.
 27. *Filteau V, DesCoteaux L.* 1998. Valeur predictive de l'utilisation de l'appareil echographique pour le diagnostic precoce de la gestation chez la vache laitiere. *Medecin Veterinaire du Quebec*.28.81-85.
 28. *Franco OJ, Drost M, Thatcher MJ, Shille VM, Thatcher WW.* 1987. Foetal survival in the cow after pregnancy diagnosis by palpation per rectum. *Theriogenology*.27.631-643.
 29. *Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML.* 2003. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals after first timed insemination. *Journal of Dairy Science*.86.3941-3950.
 30. *Friedrich M, Holtz W.* 2010. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reproduction in Domestic Animals*.45.142-146.

31. Gandy B, Tucker W, Ryan P, Williams A, Tucker A, Moore A, Godfrey R, Willard S. 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF™) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*.56.637-647.
32. Giordano JO, Guenther JN, Lopes Jr G, McGrath MF, Howard J, Branen JR, Fricke PM. 2012. Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pregnancy specific protein B (PSPB), and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*.95.683-697.
33. Gordon I. 1996. Pregnancy testing in cattle. In: *Controlled reproduction in cattle and buffaloes*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.pp. 167-195.
34. Green JA, Parks TE, Avalle MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, McMillan W, Mathialagan N, Hook RR, Xie S, 2005. Roberts RM. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*.63.1481-1503.
35. Hanzen Ch, Delsaux B. 1987. Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Veterinary Record*. 21.200-202.
36. Hanzen Ch, Laurent Y. 1991. Application de l'echographie bidimensionnelle au diagnostic de gestation et l'evaluation de l'incidence de la mortalit, embryonnaire dans l'espece bovine. *Annales Medicine Veterinaries* 134.481-487.
37. Hanzen Ch, Pieterse M, Szenci O, Drost M. 2000. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Veterinary Journal*.159.161-170.
38. Heap RB, Holdsworth RJ, Gadsby JE, Laing JA, Walster DE. 1976. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *British Veterinary Journal*. 132.445-464.
39. Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeanguyot N, Thibier M, Sasser RG. 1988a. Pregnancy specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*.83.215-223.
40. Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeanguyot N, Thibier M, Sasser RG. 1988b. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*. 30.257-267.
41. Humblot P, Jeanguyot N, Ruder CA, Leriche I, Thibier M, Sasser RG, Accuracy of pregnancy diagnosis by PSPB RIA in the plasma of dairy cows 28 days after AI. In: *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland, Vol 2. Brief communications paper no. 94, 1988c. pp.3.*
42. Ito K, Ikemizu Y, Takahasdi Y, Kawahata K, Goto T. 1994. Early pregnancy factor: EPF-like substance(s) purified from pregnant bovin ovary and in vitro fertilized ovum culture medium. *Journal of Reproduction and Development*.41.85-92.

43. *Käppel ND, Pröll F, Gauglitz G.* 2007. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. *Biosensors and Bioelectronics.* 22.2295-2300.
44. *Karen A, Bajcsy ÁCs, Szenci O.* Accuracy of transrectal ultrasonography and progesterone tests for diagnosis of non-pregnancy at day 21 after insemination in dairy cows. *Proceedings of the Hungarian Association for Buiatrics, Kecskemét, 2012.* pp. 139-141.
45. *Kastelic JP, Curran S, Pierson RA, Ginther OJ.* 1988. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology.* 29.39-54.
46. *Kastelic JP, Curran S, Ginther OJ.* 1989. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology.* 31.813-820.
47. *Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ.* 1991. Ultrasonic detection of the conceptus and characterisation of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology.* 35.569-581.
48. *Kirakofe GH, Wright JM, Schalles RR, Ruder CA, Paris S, Sasser RG.* 1993. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *Journal of Animal Science.* 71.2199-2205.
49. *Klima F, Tiemann U, Pitra C, Kauffold P.* 1987. Serological detection of early pregnancy in cattle and partial characterization of a serum glycoprotein associated with early pregnancy. *Journal of Reproduction and Immunology.* 11.31-39.
50. *Klima F, Tiemann U, Schadow D, Fasinski M, Savoly SB, Loose R, Pitra C.* 1992. Bovine early pregnancy factor (EPF) activity dependent on a 67-kDa polypeptide. *Journal of Reproductive Immunology.* 21.57-70.
51. *Koch E.* 1986. Early pregnancy factor: its significance as an indicator of fertilization and embryonic mortality. In: *Screenan JM, Diskin MG, eds. Embryonic mortality in farm animals.* Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. pp.74-92.
52. *Lassauzet MLG, Thurmond MC, Walton RW.* 1989. Lack of evidence of transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation of dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 195.1732-1733.
53. *LeBlanc SJ.* 2013. Field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 96.2345-2348.
54. *Lynch RA, Alexander BM, Sasser RG.* 1992. The cloning and expression of the pregnancy-specific protein B (bPSPB) gene. *Biology of Reproduction.* 46(Suppl. 1):72.
55. *McCaughey WJ, Gilmore JG.* 1990. A note on pregnancy diagnosis in suckler cows using a Doppler ultrasonic detector. *Irish Veterinary Journal.* 43.83-85.
56. *Morton H, Hegh V, Clunie GJA.* 1974. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition. *Nature.* 249.459-460.

57. *Morton H, Rolfe BE, Anderson M, Morrison J.* 1977. An early pregnancy factor detected in human serum by rosette inhibition test. *Lancet*.1.394-397.
58. *Morton H, Clunie GJA, Shaw FD.* 1979. A test for early pregnancy in sheep. *Research Veterinary Science*.26.261-262.
59. *Nancarrow CD, Wallace ALL, Grewal AS.* 1981. The early pregnancy factor of sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*.30.191-197.
60. *Nation DP, Malmo J, Davis GM, Macmillan KL.* 2003. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Australian Veterinary Journal*.81.63-65.
61. *Nebel RL.* 1985. Detect pregnancy in 20 to 24 days. *Dairy Herd Management*.22.14-24.
62. *Nebel RL, Altemose DL, Munkittrick TW, Sprecher DJ, McGilliard ML.* 1989. Comparisons of eight commercial on-farm milk progesterone tests. *Theriogenology*. 31.753-764.
63. *Noakes D.* 1985. Pregnancy diagnosis in cattle. In *Practice*.(March issue):46-51.
64. *Paisley GL, Mickelsen WD, Frost OL.* 1978. A survey of the incidence of prenatal mortality in cattle following pregnancy diagnosis by rectal palpation. *Theriogenology*.9.481-491.
65. *Paisley LG, Davis WC, Anderson PB, Mickelsen WD,* 1982. Detection of early pregnancy factor in swine: A need for dialogue. *Theriogenology*.18.393-401.
66. *Piechotta M, Bollwein J, Friedrich M, Heilkenbrinker T, Passavant C, Branen J, Sasser G, Hoedemaker M, Bollwein H.* 2011. Comparison of commercial ELISA blood tests for early pregnancy detection in dairy cows. *Journal of Reproduction Development*.57.72-75.
67. *Pieterse MC, Szenci O, Willemsse AH, Bajcsy ACS, Dieleman SJ, Taverne MAM.* 1990. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a quantitative and qualitative milk progesterone test. *Theriogenology*. 33.697-707.
68. *Richardson RD, Mortimer RG, Whittier JC.* 2010. Comparison of fetal losses from diagnosis of pregnancy using ultrasonography or rectal palpation in beef heifers by novice or experienced technicians. *The Professional Animal Scientist*.26.341-346.
69. *Robertson HA, Sarda IR.* 1971. A very early pregnancy test for mammals; its application to the cow, ewe and sow. *Journal of Endocrinology*.49.407-419.
70. *Rolfe B, Cavanagh A, Forde C, Bastin F, Chen C, Morton H.* 1984. Modified rosette inhibition test with mouse lymphocytes for detection of early pregnancy factor in human pregnancy serum. *Journal of Immunological Methods*.70.1-11.
71. *Rolfe B.* 1982. Detection of foetal wastage. *Fertility and Sterility*. 37.655-660.

72. Romano JE, Thompson JA, Forrest DW, Westhusin ME, Tomaszewski MA, Kraemer DC. 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*.66.1034-1041.
73. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC, Westhusin ME, Forrest DW, Tomaszewski MA. 2007. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology*.67.486-493.
74. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC, Westhusin ME, Tomaszewski MA, Forrest DW. 2011. Effects of early pregnancy diagnosis by palpation per rectum on pregnancy loss in dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association*.239.668-673.
75. Ruder CA, Sasser RG. 1986. Source of bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) during the postpartum period and estimation of half-life of bPSPB. *Journal of Animal Science*.63.335.
76. Sasser RG, Alexander BM, Ruder CA. 1991. Pregnancy detection in postpartum cows by measurement of pregnancy specific protein B (PSPB). *Journal of Animal Science*.69.660.
77. Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC. 1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biology of Reproduction*.35.936-942.
78. Semambo DKN, Eckersall PD, Sasser RG, Ayliffe TR. 1992. Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*.37.741-748.
79. Smith RD. 1991. Evaluation of diagnostic tests. In: *Veterinary clinical epidemiology. A problem-oriented approach*. Butterworth Heinemann. pp.29-43.
80. Stem ES, Shin SJ, Arlitsch HS. 1984. Bacteremia after rectal examination in cattle. *Veterinary Record*.114.638-639.
81. Szenci O, Piros A, Kovács L. 1990. Early bovine pregnancy diagnosis by a battery operated portable ultrasonic scanner the Ultra-Scan. *Proceedings 16th World Buiatrics Congress, Salvador, Brazil*.pp.219-223.
82. Szenci O, Gyulai Gy, Nagy P, Kovács L, Varga J, Taverne MAM. 1995. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. *Veterinary Quarterly*.17.37-39.
83. Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser G, Taverne MAM, Varga J, Baltusen R, Schekk Gy. 1998a Comparison of ultrasonography bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*.50.77-88.

84. Szenci O, Taverne MAM, Beckers JF, Sulon J, Varga J, Börzsönyi L, Hanzen Ch, Schekk Gy. 1998b. Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows measuring plasma levels of bovine pregnancy associated glycoprotein (bPAG). *Veterinary Record*.142.304-306.
85. Szenci O, Varga J, Bajcsy ÁCs, 1999. Role of early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography in improving reproductive efficiency in a dairy herd: a retrospective study. *Bovine Practitioner*.33.67-69.
86. Szenci O, Beckers JF, Sulon J, Bevers MM, Börzsönyi L, Fodor L, Kovács F, Taverne MAM, 2003. Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoproteins in heifers. *Veterinary Journal*.165.307-313.
87. Szenci O, Karen A, Mellert M, Solymosi P, Juhász J, Kaltenecker A, Kulcsár M, Mádl I, Tibold J, Bajcsy ÁCs. Comparing four different milk progesterone tests with transrectal ultrasonography in the cow: Preliminary results. *Proceedings of the Hungarian Association for Buiatrics, Eger, 2010. pp. 49-51.*
88. Taverne MAM, Szenci O, Szétag J, Piros A. 1985. Pregnancy diagnosis in cows with linear-array real-time ultrasound technique: a preliminary note. *Veterinary Quarterly*.7.264-270.
89. Thompson JA, Marsh WE, Calvin JA, Etherington WG, Momont HW, Kinsel ML. 1994. Pregnancy attrition associated with pregnancy testing by rectal palpation. *Journal of Dairy Science*.77.3382-3387.
90. Thompson JA, Marsh WE, Etherington WG, Momont HW, Kinsel ML. 1995. Evaluation of the benefits of the timing of pregnancy testing by transrectal palpation in dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*.207.1462-1465.
91. Threlfall WR. 1994. Immunosuppressive early pregnancy factor (ISEPPF) detection for pregnancy diagnosis in dairy cows. *Theriogenology*. 41.317. (Abstr.)
92. Thurmond MC, Picanso JP. 1993. Foetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*.203.432-435.
93. Totey SM, Singh G, Taneja M, Talwar GP. 1991. Ultrasonography for detection of early pregnancy following embryo transfer in unknown breed of *Bos indicus* cows. *Theriogenology*.35.487-497.
94. Vaillancourt D, Bierschwal CJ, Ogwu D. 1979. Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *Journal of American Veterinary Medical Association*.175.466-468.
95. Van der Lende T, Schasfoort RBM, van der Meer RF. 1992. Monitoring reproduction using immunological techniques. *Animal Reproduction Science*.28.179-185.

96. *Vasquez MI, Horta AEM, Marques CC, Sasser RG, Humblot P.* 1995. Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. *Animal Reproduction Science.*38.279-289.
97. *Warnick LD, Mohammed HO, White ME, Erb HN.* 1995. The relationship of the interval from breeding to uterine palpation for pregnancy diagnosis with calving outcomes in Holstein cows. *Theriogenology.* 44.811-825.
98. *White ME, LaFaunce N, Mohammed HO,* 1989a. Optimal time postbreeding for pregnancy examination in dairy cattle. *Canadian Veterinary Journal.*30.147-149.
99. *White ME, LaFaunce N, Mohammed HO.* 1989b. Calving outcomes for cows diagnosed pregnant or non-pregnant by per rectum examination at various intervals after insemination. *Canadian Veterinary Journal.*30.867-870.
100. *Xie S, Low BG, Nagel RJ, Kramer KK, Anthony RV, Zoli AP, Beckers JF, Roberts RM.* 1991. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88.10247-10251.
101. *Xie S, Green J, Beckers JF, Roberts RM.* 1995. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene.*159.193-197.
102. *Yamazaki S, Kawahata K, Goto T, Takahashi J, Yasuda Y.* 1995. EPF as a marker for early embryonic losses in repeat breeders. *Journal of Reproduction and Development.*41.129-132.
103. *Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H.* 1995. Application of anti-bovine CD2 monoclonal antibody to the rosette inhibition test for detection of early pregnancy factor in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science.*57.721-725.
104. *Youngquist RS.* Pregnancy diagnosis. In: *Youngquist RS, ed. Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* Philadelphia, USA: WB Saunders Company, 1997. pp. 295-303.
105. *Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F.* 1991. Purification and characterization of a bovine pregnancy associated glycoprotein. *Biology of Reproduction.*45.1-10.
106. *Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF.* 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction.*46.83-92.

PRECIZNOST TRANSREKTALNE ULTRASONOGRAFIJE I PROGESTERONSKIH TESTOVA U DIJAGNOSTIKOVANJU NE-STEONOSTI 21 DAN NAKON INSEMINACIJE KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

Szenci O.^{1,2}, Szelényi Z.^{1,2}, Karen A.¹, Horváth A.^{1,2},
Bajcsy Cs. Á.^{1,2}

Optimalni interval od teljenja do naredne koncepcije iznosi 85 do 115 dana i zahteva intenzivne aktivnosti u smislu reproduktivnog menadžmenta prvih 100 dana nakon teljenja. Osemenjavanje mlečnih krava u ranom postpartalnom periodu rezultira većim brojem potomaka i boljom mlečnošću po laktaciji, ali treba imati u vidu da je kod ovakvog pristupa i indeks osemenjavanja veći, a embrionalni mortalitet učestaliji (Britt, 1975). Loše reproduktivne performanse smanjuju broj rođenih teladi i produkciju mleka, a povećavaju troškove terapije i broj doza utrošenih za osemenjavanje.

Precizna detekcija steonih i krava koje nisu steone, kao i trudnoća koje su prekinute, predstavlja ključni faktor kojim postizemo optimalne rezultate u skraćivanju vremenskog intervala od teljenja do naredne koncepcije. Utvrđeno je da dijagnostika graviditeta nakon 30-og dana od inseminacije skraćuje međutelidbeno vreme (Thompson et al., 1995; Baxter and Ward, 1997), međutim prerana palpacija uterusa može prouzrokovati manji broj teljenja (Thompson et al., 1994).

Procena dijagnoze graviditeta

Pouzdanost dijagnostičke metode i tačnost dijagnoze mogu biti evaluirani upotrebom 2x2 tabele (Tabela 1), za koju su dobijeni podaci za sva polja (Smith, 1991). Dva parametra se tradicionalno upotrebljavaju za opisivanje karakteristika dijagnostičkih metoda. Sensitivnost (Se) se može definisati kao mogućnost pozitivnog testa kod krava za koje se zna da su se telile. Jednačina koja opisuje senzitivnost je $a/(a+d) \times 100$.

Nasuprot senzitivnosti, specifičnost (Sp) se može definisati kao mogućnost dobijanja negativnog testa kod krava za koje se zna da nisu steone, jednačina je sledeća $c/(c+b) \times 100$. Iako su senzitivnost i specifičnost dijagnostičke metode bitni parametri, kliničari bi trebalo da budu više zabrinuti za prediktivnu vrednost dijagnostičke metode, tj. mogućnost metode da adekvatno reflektuje status životinje, odnosno da li je steona ili nije. Pozitivna prediktivna vrednost (+PV) je verovatnoća prisustva graviditeta kod jedinke kod koje dijagnostikovana trudnoća, $a/(a+b) \times 100$. Negativna prediktivna vrednost (-

PV) je verovatnoća odsustva graviditeta kod jedinke kod koje trudnoća nije dijagnostikovana, $c/(c+d) \times 100$ (Hanzen et al., 2000).

Tabela 1. Rezultati dijagnostičkih testova Smith (1991)

Dijagnoza	Steona	Nije steona
Steona	a (tačno pozitivno)	b (netačno pozitivno)
Nije steona	d (netačno negativno)	c (tačno negativno)

Testovi na graviditet kod krava

Rektalna palpacija u cilju dijagnostike graviditeta kod krava

Mnogo godina je palpacija uterusa *per rectum* bila opšte prihvaćena metoda za dijagnostiku graviditeta kod goveda. U zavisnosti od iskustva pregledača dijagnostika graviditeta *per rectum* od 30-od dana nakon inseminacije može biti korišćena do samog termina porođaja. U novijoj studiji se pokazalo da senzitivnost i specifičnost rektalne palpacije iznosi 98.8 odnosno 87%, ukoliko se dijagnoza postavlja od 37 do 43 dana nakon inseminacije (Warnick et al., 1995). Glavna prednost ove metode dijagnostike graviditeta su jednostavnost i to što nema troškova, iskusnom kliničaru su potrebne samo rukavice za pregled (širete). Da bi izbegla iritacija rektuma jedinke pregledač može koristiti rukavice za pregled izrađene od lateksa. Još jedna prednost ove metode je momentalno postavljanje dijagnoze, steona ili nije steona, što omogućava brzo tretiranje životinje u cilju skraćivanja međutelidbenog perioda (Arthur et al., 1996).

Postoje tri metode koje se najčešće koriste prilikom rektalne palpacije:

Palpacija fluktuacije uterusa- od 30 do 35 dana gestacije, asimetrija u veličini rogova materice (zbog prisustva alantoične tečnosti koja gravidnom rogu povećava tonus i čini ga fluktuantnim) dobar je indikator graviditeta (Abbitt et al., 1978). Neka druga stanja poput piometre, mukometre, hidrometre ili loša postpartalna involucija uterusa mogu izazvati slične promene na uterusu koje osećamo prilikom rektalne palpacije (Arthur et al., 1996). Starost i broj teljenja takođe utiču na veličinu materičnih rogova. Bilateralna blizanačka trudnoća može rezultirati uvećanjem oba materična roga, uz prisustvo graviditetnog žutog tela na oba jajnika.

Palpacija alantohoriona- od 35 do 40 (pa i do 95 dana) gestacije, alantohorionska se može palpirati korišćenjem tzv. „slip“ tehnike. Nakon što smo locirali bifurkaciju materičnih rogova, uvećani rog hvatamo između palca i srednjeg prsta, malo kranijalno od bifurkacije, nežno stegnemo rog. Alantohorion možemo osetiti kao veoma finu strukturu koja nam klizi između prstiju. Od 60 dana gestacije preporučuje se palpacija negravidnog roga pošto se u njemu alantohorionska membrana može lakše osetiti (Abbitt et al., 1978).

Palpacija amnionske vezikule- Amnionska vezikula je palpabilna od 28 dana kod junica, i od 32- 35 dana kod pluriparih jedinki , sve do 65 dana gestacije. Palpacija amnionske vezikule slična je palpaciji alantohoriona. Uvećani rog se palpira celom dužinom. Amnionska vezikula se palpira kao sferična struktura ispunjena fluidom dijametra 1-2cm koja pliva u alantoičnoj tečnosti. Obično je smeštena na kranijalnom rubu interkornualnog ligamenta. Vezikula se ne sme pritiskati jako, u obzir dolazi samo blago palpiranje (Abbitt et al., 1978).

White i sar. (1989a) kažu da je optimalno vreme za dijagnostiku graviditeta rektalnom palpacijom u periodu od 51 do 56 dana nakon veštačkog osemenjavanja. Međutelidbeni interval je značajno kraći kod ovih krava (369 dana) u poređenju sa kravama koje su pregledane od 30 do 55 dana (377 dana) ili nakon 57 dana (378 dana). Takođe krave kojima je graviditet dijagnostikovao pre 41 dana nakon inseminacije, su imale mnogo manje šanse za dobijanje telea nego krave kojima je graviditet dijagnostikovao kasnije (White et al., 1989b). Krave kojima je graviditet dijagnostikovao 30 do 36 dana nakon inseminacije-parenja imale su 2 nedelje duži međutelidbeni period u odnosu na krave koje su pregledane nešto kasnije (Warnick et al., 1995).

Najveći nedostatak rektalne palpacije kao metode dijagnostike graviditeta je taj što rektalna manipulacije uterusom (palpacija uterusne fluktuacije, palpacija fetalnih membrana, alantohoriona ili amnionske vezikule) povećava rizik embrionalne smrti. Abbitt i sar. (1978) palpacija uterusa na fluktuaciju kod krava koje su steone od 35 do 70 dana predstavlja pouzdan metod dijagnostike graviditeta, ali upotreba „slip“ tehnike, i u manjoj meri palpacije amnionske vezikule rezultira povećanjem broja fetalnih uginuća. Značajne jatrogene uzroke fetalnih uginuća su prijavili i (Abbitt i sar., 1978; Franco i sar., 1987; White i sar., 1989b; Thurmond i Picanso, 1993). Ostali istraživači međutim nisu mogli da potvrde jatrogeni efekat rektalne palpacije (Paisley i sar., 1978; Vaillancourt i sar., 1979). U novije vreme ispitivan je efekat tzv. „slip“ tehnike na fetalna uginuća i to pomoću neinvazivne metode (PSPB RIA test, konceptus proteini). Prilikom ovog istraživanja nisu utvrđene značajne razlike između kontrolne i ogleadne grupe, pa se može izvesti zaključak da embrionalni mortalitet nije izazvan rektalnom palpacijom. Međutim teško je razdvojiti fetalna uginuća izazvana rektalnom eksploracijom od onih spontanijih gubitaka koji se dešavaju kod krava koje nisu pregledane (Alexander i sar., 1995).

Takođe, nikakav jatrogeni efekat nije prijavljen prilikom korišćenja „slip“ tehnike ni od (Romano i sar. 2007 i 2011.), međutim neiskustvo pregledača prilikom izvođenja rektalne palpacije može izazvati veći broj fetalnih uginuća i prekida graviditeta (Richardson i sar., 2010).

Uloga rektalne palpacije u prenošenju infektivnih oboljenja nije poznata (Youngquist, 1997). Kod nekih krava međutim može izazvati bakterijemiju (Stem i sar., 1984), stoga i pregledač mora biti svestan da rektalna palpacija nije sasvim bez rizika (Youngquist, 1997). Postoji nedostatak dokaza o transmisiji bovine

leukemija virusa (BLV) tokom rutinske rektalne eksploracije kod mlečnih krava (Lassauzet i sar., 1989). U zapahtima u kojima se sprovode mere sprečavanja prenošenja BLV, bitno je koristiti nove, čiste rukavice za pregled- rektalnu palpaciju svake krave (Youngquist, 1997).

Ultrasonografija u dijagnostici graviditeta krava

Ultrazvučna tehnologija je iz humane prešla u veterinarsku praksu, a raspoloživi transduceri i skeneri su determinisali vrstu i način pregleda. Sedamdesetih godina prošlog veka A-mod (analizator dubine) i ultrazvuk sa Doplerom (detektuje fetalno srce i protoke u umbilikalnim krvnim sudovima) su postali uobičajena praksa. Međutim ove tehnike nisu poboljšale dijagnostiku graviditeta na farmama (Barlett i Sorensen, 1980; Noakes, 1985; McCaughey i Gilmore, 1990; Cameron i Malmo, 1993). Razvoj „real-time B-mod“ ultrasonografije i sonde veće frekvencije je doveo do veće upotrebe ultrasonografije na komercijalnim farmama. Visoka frekvencija obezbeđuje sliku bolje rezolucije, ali je manja prodornost tj. dubina tkiva koje možemo gledati. Prilikom ultrazvučnog pregleda, krava se smatra steonom ukoliko se u lumenu uterusa uoče anehogene crne tačke ili tačka nepravilnog oblika, što bi trebalo da predstavlja alantoisnu tečnost. Prikaz embrionalnih membrana (Nation i sar., 2003) i/ili embriona (Szenci i sar., 1998a) pruža dodatnu potvrdu da se radi o graviditetu (Tabela 2). Ukoliko se ovakvi znaci ne uoče graviditet se isključuje kao opcija i postavlja se dijagnoza da krava nije steona. Potvrda ultrazvučne dijagnoze se obično postavlja rektalnim pregledom 2 do 3 meseca nakon inseminacije, ili nakon pojave spontanog estrusa nakon veštačkog osemenjavanja. Krava se takođe smatra steonom ukoliko se prilikom UZ pregleda 50 do 60 dana nakon inseminacije uoči embrion sa srčanom aktivnošću.

Tabela 2. Karakteristike identifikovane korišćenjem ultrazvuka za dijagnostiku graviditeta, prvi dan detekcije

Karakteristike	Prvi dan detekcije (*Curran i sar., 1986a, 1986b; Curran i Ginther, 1991)	Prvi dan detekcije (Totey i sar., 1991)
Pravilni embrioni	19 do 24	19.5±0.7
Srčana akcija	19 do 24	22.6±0.9
Alantois	22 do 25	23.1±0.8
Kičmena moždina	26 do 33	33.0±1.5
Začeci prednjih ekstremiteta	28 do 31	32.7±1.3
Amnion	28 do 33	25.1±1.4
Očne orbite	29 do 33	33.6±1.4
Začeci zadnjih ekstremiteta	30 do 33	32.9±1.3
Placentomi	33 do 38	35.2*
Papci	42 do 49	44.6*
Fetalni pokreti	42 do 50	50.7±1.30
Rebra	51 do 55	60.9±1.7
Pol fetusa	50 do 100	

Zbog činjenice da su prvi ultrazvučni aparati u veterinarskoj praksi došli iz humane medicine, i da su bili opremljeni linearnim ili sektorskim sondama od 3.0 do 3.5 MHz, preciznost istih je izučavana (Taverne i sar., 1985; Chaffaux i sar., 1986; Hanzen i Delsaux, 1987). U terenskim uslovima prihvatljivi rezultati (senzitivnost 77.7-100%, specifičnost 78.7-92.3%) kod goveda su mogli biti postignuti od 36 dana nakon inseminacije. Zbog toga sonde manje frekvence (3.0 ili 3.5MHz) ne pružaju prednost u odnosu na rektalnu palpaciju i biohemijske metode dijagnostike graviditeta, pošto ove metode nisu pogodne za preciznu dijagnostiku graviditeta pre 40 dana od osemenjavanja.

Transrektalna real-time B-mod ultrasonografija uterusa, uz korišćenje linearne ili sektorske sonde (Tabela 3) frekvence 5.0MHz predstavlja visoko preciznu metodu za dijagnostiku graviditeta već od 25-26 dana nakon inseminacije. Ispitivanja tokom terenskih studija su potvrdila da je kod 2 do 5% pregledanih jedinki postavljena pogrešna dijagnoza da nisu steone, a kod 8.7 do 36% krava koje nisu steone je postavljena dijagnoza da su steone (Pieterse i sar., 1990; Szenci i sar., 1990; Hanzen i Laurent, 1991). Sudeći po Badtram i sar. (1991), senzitivnost i specifičnost ultrazvučnog pregleda u periodu od 23 do 31 dana nakon inseminacije iznosila je otprilike samo 68.8% i 71.7% . U skorijoj

studiji maksimalna senzitivnost i negativna prediktivna vrednost je postignuta 26 dana kod junica i 29 dana kod krava (Romano i sar., 2006).

Tabela 3. Preciznost ultrasonografije u dijagnostici graviditeta kod krava pri korišćenju linearne ili sektorske sonde frekvencije 5.0 MHz

Reference	Dani nako v.o.	A (n)	b (n)	c (n)	d (n)	Se (%)	Sp (%)	+PV (%)	-PV (%)
1	21-25	13	6	28	16	44.8	82.3	68.4	63.6
	26-33	43	5	36	1	97.7	87.8	89.6	97.2
2	17-24	17	5	30	34	33	86	77	47
	25-29	54	4	42	1	98	91.3	93	97.6
	30-39	87	0	56	0	100	100	100	100
3	16-31	80	35	107	77	51.0	75.4	69.6	58.2
	23-31	NG	NG	NG	NG	68.8	71.7	71.1	ND
4	<30	42	6	7	2	95	54	88	78
	30-39	502	63	132	25	95	67	89	84
	40-49	444	39	129	8	98	77	92	94
5	22-40	NG	NG	NG	NG	96.2	71.1	89.6	87.8
6 (krave)	25-28	187	24	405	11	94.4	94.4	88.6	94.4
	29	42	4	105	0	100	96.3	91.3	100
	30	34	3	114	0	100	97.4	91.9	100
6 (junice)	24-25	48	5	57	3	94.1	91.9	90.6	95
	26	17	1	30	0	100	96.7	94.4	100
	27	25	2	26	0	100	92.8	92.6	100

NG: not given

7. Pieterse i sar., 1990
8. Szenci i sar., 1990
9. Badtram i sar., 1991
10. Hanzen i Laurent, 1991
11. Filteau i DesCoteaux, 1998 (n=435)
12. Romano i sar., 2006

U kontrolisanim ekperimentalnim uslovima, preciznost linearne sonde frekvence 5.0 MHz u dijagnostici ranog graviditeta kod junica nije bila visoka (<64.2%) do 16 dana od parenja-inseminacije, ali se preciznost povećavala nakon 18 dana i iznosila je 100% do 20 dana od inseminacije. U ovim eksperimentima su ispitivane junice koje nisu u priplodu u cilju dijagnostike ne-steenosti (Kastelic i sar., 1988, 1989). Slični rezultati nisu mogli biti dobijeni u terenskim uslovima.

Transrektalna real-time B-mod ultrasonografija uterusa uz korišćenje linearne sonde frekvencije 7.5MHz (Tabela 4.), omogućava preciznost od čak

90% u selektiranju gravidnih (senzitivnost 90.4%) i negravidnih životinja (specifičnost 96%) od 29, 30 dana pa nadalje (Szenci i sar.,1998a). Kada se prepoznavanje pravilnog embriona sa srčanom akcijom uvelo kao kriterijum za postavljanje pozitivne ultrazvučne dijagnoze na graviditet, postavljen je značajno ($P < 0.001$) manji broj lažno negativnih i lažno pozitivnih ultrazvučnih dijagnoza, u poređenju sa prepoznavanjem alantoisne tečnosti kao kriterijumom za postavljanje dijagnoze. Sa izuzetkom jedne lažno pozitivne i dve lažno negativne dijagnoze nakon 33 dana od inseminacije, nisu pravljene greške u razlikovanju gravidnih od negravidnih jedinki, kada je alantoisna tečnost korišćena kao kriterijum u postavljanju dijagnoze na graviditet (Szenci i sar.,1998a).

Tabela 4. *Table 4. Preciznost ultrasonografije u dijagnostici graviditeta kod krava pri korišćenju linearne sonde frekvencije 7.5MHz*

Reference	Dani nakon v.o.	a (n)	b (n)	c (n)	d (n)	Se (%)	Sp (%)	+PV (%)	-PV (%)
1^a	26-27	29	1	73	35	45.3	98.6	96.6	67.5
	29-30	48	1	74	15	76.1	97.9	97.9	83.1
	33-34	54	0	75	6	90.0	100	100	92.5
1^b	26-27	53	4	70	11	82.8	94.5	92.9	86.4
	29-30	57	3	72	6	90.4	96.0	95.0	92.3
	33-34	58	1	74	2	96.6	98.6	98.3	97.3
2	27-31	28	0	22	6	82.3	100	100	78.5
	34-38	31	0	20	0	100	100	100	100

^a *Prepoznavanje pravilnog embriona sa srčanim otkucajima je korišćeno kao kriterijum za postavljanje pozitivne dijagnoze na graviditet*

^b *Prepoznavanje alantoisne tečnosti je korišćeno kao kriterijum za postavljanje pozitivne dijagnoze na graviditet*

3. Szenci i sar., 1998a

4. Szenci i sar., 1998b

U kontrolisanim eksperimentalnim uslovima preciznost linearne sonde od 7.5MHz (Tabela 6) u ranoj dijagnostici graviditeta bila je veoma niska (senzitivnost 40%, specifičnost 66.6%) od 11 do 16 dana od inseminacije-parenja, ali se preciznost značajno povećala nakon 17 dana, i znosila je 100% do 20 dana od dana parenja (Boyd i sar., 1990). Slični rezultati su prijavljeni i od Kastelica i sar. (1991a), međutim slični rezultati ne mogu biti postignuti u praksi iz razloga što prisustvo fluida u uterusu u ovim ranim fazama graviditeta može biti zbunjujuće.

U radu na terenu, prihvatljivi rezultati se mogu postići ultrasonografijom (korišćenjem sonde od 5 do 7.5MHz) od 25 do 30 dana nakon inseminacije

(Hanzen i Laurent, 1991; Pieterse i sar., 1990; Szenci i sar., 1990; Szenci i sar., 1998a,b). Pouzdanost pregleda umnogome zavisi od frekvence korišćene sonde kao i od iskustva pregledača (Badtram i sar., 1991), kriterijuma korišćenih za postavljanje dijagnoze (Szenci i sar.,1998a), i pozicije uterusa u karlici (Szenci i sar.,1995). Više netačnih dijagnoza je kod krava postavljeno u periodu od 24 do 38 dana od v.o. kada je uterus bio lociran kranijalnije od ulaska u karlicu, u odnosu na preglede sprovedene ranije kada je uterus pozicioniran u karlici ili na samom ulazu u nju (Szenci i sar.,1995).

Hemijski testovi za dijagnostiku graviditeta kod krava

Progesteronski testovi

Produkcija progesterona od strane graviditetnog žutog tela predstavlja ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju graviditeta. Zbog povišenih koncentracija progesterona od 20 do 24 dana nakon osemenjavanja, u cilju dijagnostikovanja graviditeta preporučuje se korišćenje testova za merenje progesterona u krvi ili mleku kod farmških životinja (Robertson i Sarda, 1971). Nivoi progesterona se mogu određivati laboratorijski radioimunoesejem (RIA) i enzimimunosejem (EIA) , ili uz pomoć raznih kitova prilagođenih za farmšku upotrebu. Nekoliko kitova za dijagnostiku graviditeta na terenu se pojavilo 1985, kada je i prvi P4 test za upotrebu na farmi postao dostupan u prodaji (Nebel,1985). Prednost ovih testova je mogućnost dobijanja rezultata na licu mesta, i ekonomičnost, bez potrebe za laboratorijom i opasnim radioizotopima. Razvoj EIA je rešio problem radioizotopa, ali i ovaj test oduzima vreme.

Pošto je progesteron liposolubiln hormon, koncentrisan je i u mleku. Pošto rukovanje uzorkom može negativno uticati na koncentraciju progesterona u plazmi ili mleku, bitno je odmah odvojiti plazmu od krvnih ćelija. Pre dostavljanja laboratoriji uzorci mleka treba da se zamrznu ili konzerviraju pomoću kalijum dihidromata (2mg) (BonDurant, 1986), ili tabletom koja sadrži kalijum dihidromat i živin hlorid (Arthur i sar.,1996). Veoma je važno da se uzorci ne izlažu visokim temperaturama ili prejakom ultraljubičastom svetlu. Iako je merenje koncentracije progesterona u plazmi validna i pouzdana laboratorijska metoda, uzimanje uzoraka krvi na terenu od strane kliničara ima neka ograničenja (Arthur i sar.,1996). Tokom popodnevnog muženja uzorci mleka sa višim procentom masti se mogu uzorkovati u plastične ili staklene epruvete.

Progesteronski test nije specifičan na prisustvo živog fetusa u uterusu (Humblot i sar.,1988a), on je samo indikator na prisustvo žutog tela, koje može, a ne mora biti udruženo sa prisustvom živog fetusa. Krave se smatraju steonim pri izvođenju progesteronskog testa ukoliko se ne ispoljavaju simptomi estrusa i ako je koncentracija progesterona povišena 20 do 24 dana od inseminacije. Nasuprot ovome, smatra se da krava nije steona ako je koncentracija progesterona niska 20 do 24 dana od inseminacije. U proceduri pri koji+oj se uzima jedan uzorak mleka,

preporučljivo je da se uzorak uzme 24 dana od inseminacije kako bi se broj uzoraka smanji, pošto je izvesno da će se kod nekih krava u ovom periodu ispoljiti simptomi estrusa (Heap i sar.,1976).

Merenjem koncentracije progesterona u mleku ili plazmi postiže se preciznost od 75 do 85% (Arthur i sar.,1996) u pravilnom identifikovanju steonih, i skoro 100% u identifikovanju krava koje nisu steone (Youngquist, 1997). Senzitivnost 67.2% i specifičnost 98.1% su rezultati dobijeni prilikom P4 merenja 24 dana nakon inseminacije (Humblot i sar., 1988a). Nasuprot ovome relativno slaba preciznost je prijavljena pri ispitivanju sprovedenom 0 i 21 dana (specifičnost RIA na uzorcima mleka 47.5%) u cilju određivanja negravidnih krava. U isto vreme senzitivnost RIA testa iznosila je 86.2% (Pieterse i sar., 1990). Osam različitih progesteronskih testova u komercijalnoj upotrebi ispitivao je Nebel i sar. (1989), i senzitivnost testova se kretala u intervalu od 75 do 86%, a specifičnost 89 do 99%. Nasuprot ovim ispitivanjima Pieterse i sar. (1990) prijavljuju visoku preciznost (senzitivnost 93.1%) u dijagnostici steonih krava, i veoma malu preciznost (specifičnost 39.3%) u dijagnostici krava koje nisu steone, testa Ovucheck EIA. Koncentracija masti u mleku, ili interakcija mlečne masti i dana ciklusa su faktori koji mogu uticati na rezultat testa.

Prednost progesteronskog testa, pogotovo ukoliko se radi o farmskim testovima koji se koriste 24 dana nakon inseminacije, jeste detekcija krava koje nisu steone u ranijoj fazi u odnosu na druge metode. Nedostatak ove metode je merenje nivoa progesterona nije specifičan test za graviditet. Povišene koncentracije progesterona 20 do 24 dana nakon inseminacije jedino ukazuju na prisustvo žutog tela koje može biti udruženo sa: conceptusom, piometrom, mrtvim embrionom, kraćim ili dužim estralnim ciklusom, abnormalnostima jajnika (lutealne ciste) ili pogrešnim vremenom inseminacije.

Zavisno od incidence pojavljivanja ovih faktora, može se menjati i učestalost lažno pozitivnih rezultata. Greške mogu negativno uticati na pojavu lažno pozitivnih dijagnoza, ali mogu povećati i broj lažno negativnih dijagnoza neadekvatnim uzorkovanjem tj.mešanjem mleka (malo masti u uzorku), nedostataka u skladištenju mleka ili maloj produkciji progesterona od strane žutog tela. Progesteronski testovi su ekonomični, pogotovo ukoliko se upotrebljavaju za detekciju krava koje nisu steone, i ukoliko su praćeni rektalnim pregledom u cilju potvrđivanja graviditeta 6 do 8 nedelja nakon inseminacije (Booth, 1987). Korišćenjem tri individualna uzorka uzeta u razmaku od nedelju dana u periodu od 35 do 49 dana, može se povećati preciznost u dijagnostikovanju steonik i krava koje nisu steone (Barth i sar., 1989). Slično ovome, dva do tri uzorkovanja u periodu 20 do 24 dana nakon inseminacije povećavaju preciznost izvedenog progesteronskog testa. Širu upotrebu progesteronskog testa u praksi limitira cena testiranja i varijacije u preciznosti testa.

Upotreba testa u farmskoj proizvodnji se preporučuje u cilju procene preciznosti detekcije estrusa. Zbog grešaka koje se događaju u detekciji estrusa na farmama, čak 20% krava dude osemenjeno tokom lutealne faze ciklusa. Zbog toga je identifikovanje ovih jedinki merenjem nivoa progesterona pre inseminacije od velikog značaja (Szenci i sar., 2010). Međutim, niska koncentracija progesterona nakon jednog uzorkovanja ne znači obavezno da je krava u estrusu. Prisustvo estralne sluzi, i rigidan, kontraktilan uterus treba da budu uzeti u obzir (Arthur i sar., 1996).

Sa skorijim razvojem imunosenzora, automatizovano real-time merenje koncentracija progesterona na dnevnom nivou u izmuzištima je takođe moguće (Van der Lende i sar., 1992; Claycomb i sar., 1995; Delwiche i sar., 2001; Käppel i sar., 2007). Tokom muže, dijagnostika subfertiliteta mlečnih krava u postpartalnom periodu merenjem koncentracija progesterona u mleku (Gordon, 1996) i selekcija krava koje su u estrusu (Delwiche i sar., 2001) je od velikog značaja.

Konceptus proteini (PSPB, PAG)

Ćelije trofoblasta, mono i binukleusne ćelije tokom ranog razvoja konceptusa goveda sintetišu značajne količine proteina. Među njima je opisan i bovine pregnancy specific protein B (bPSPB)- specifični protein graviditeta goveda, koji ulazi u maternalni krvotok. Takođe, opisan je i i protein u vezi sa bPSPB, bovine pregnancy associated glycoprotein (bPAG; Zoli et al., 1991) ili bPAG1 (Xie i sar., 1991). PSPB (Sasser i sar., 1986) i bPAG1 (Xie i sar., 1991) su inaktivne proteinaze aspartatske kiseline, i identični su u pogledu sekvence nukleotida (Lynch i sar., 1992; Vasquez i sar., 1995; Xie i sar., 1995). Izolovani preparati bPSPB i bPAG1 se mogu razlikovati u ugljenim hidratima i sijalnoj kiselini, što donekle objašnjava manje razlike u profilu i nestanku iz maternalne cirkulacije nakon teljenja ili embrionalnog uginuća (Szenci i sar., 1998a; Beckers i sar., 1998, 1999). Pošto su bPSPB and bPAG1 prisutni u maternalnoj cirkulaciji tokom graviditeta, i jedan i drugi predstavljaju dobre indikatore prisustva živog embriona. I bPSPB i bPAG1 bili su detektovani u serumu nekih steonih krava već od 15 do 22 dana (Sasser i sar., 1986; Zoli i sar., 1992, Giordano i sar., 2012) nakon inseminacije.

Zbog odloženog pojavljivanja ovih proteina u krvi nekih krava, veća preciznost u dijagnostici graviditeta se postiže ukoliko se ispitivanja sprovode 28-30 dana pa nadalje (Humblot i sar., 1988c; Szenci i sar., 1988a,b; Vasquez i sar., 1995). I bPSPB i bPAG1 su detektovani u perifernoj cirkulaciji tokom postpartalnog perioda, 70-100 dana nakon teljenja (Zoli i sar., 1992; Kirakofe i sar., 1993). U novijoj studiji, pokazano je da je bilo 56.7% i 44.9% lažno pozitivnih dijagnoza baziranih na određivanju bPSPB i bPAG1 kod krava koje su osemenjene u periodu do 70 dana nakon teljenja (Szenci i sar., 1998a). Ovi podaci nam ukazuju da prisustvo bPSPB i bPAG1 u plazmi krava tokom ranog

postpartalnog perioda može ograničiti primenu ovih ispitivanja u terenskim uslovima. Interferencija postpartalnih koncentracija bPSPB i bPAG1 se može minimizirati ukoliko se za izvođenje testova selektiraju samo krave osemenjene nakon 50 dana od teljenja (Sasser i sar., 1991) ili 70 dana od teljenja (Ruder i Sasser, 1986; Humblot i sar., 1988a,b). Još jedno ograničenje predstavlja i održavanja nivoa ovih proteina iznad nivoa koji se smatraju indikativnim da se radi o graviditetu (tj. iznad praga) i nakon embrionalnog uginuća, iako im koncentracije lagano opadaju (Semambo i sar., 1992; Szenci i sar., 2000). Ovo je verovatno povezano sa relativno dugim vremenom poluživota (7-8 dana za bPSPB i 3-4 dana za bPAG1) u maternalnom krvotoku nakon uginuća ploda (Semambo i sar., 1992; Szenci i sar., 2003). Dalja ograničenja u testiranju proteina krvi korišćenjem RIA (Sasser i sar., 1991; Zoli i sar., 1992) i ELISA testova (Green i sar., 2005; Breed i sar., 2009; Piechotta i sar., 2011) predstavljaju stroge kontrole procedure uzimanja uzoraka, i vreme koje protekne od uzimanja uzoraka do postavljanja dijagnoze, 2 do 3 dana. U cilju prevazilaženja prethodno navedenih ograničenja skoro je razvijen ELISA test za mleko (Friedrich i Holtz, 2010; Byrem i sar., 2012; LeBlanc, 2013), međutim pravo rešenje bi predstavljalo razviće testa koji bi mogao da se koristi u farmskim uslovima.

Faktor ranog graviditeta- Early pregnancy factor

Najranije utvrđeni indikator prisustva vijabilnog fetusa i uspešne fertilizacije sastavni je deo seruma, i prvi put je otkriven kod miša (Morton i sar., 1974). Ova supstanca je poznata i kao faktor ranog graviditeta- early pregnancy factor (EPF), a opisana je i kod žena (Morton i sar., 1977), ovaca (Morton i sar., 1979), goveda (Nancarrow i sar., 1981) i svinja (Paisley i sar., 1982).

Osobine EPF su sledeće:

- Rano pojavljivanje (nekoliko sati) nakon parenja-inseminacije (Morton i sar., 1977)
- Brzo nestajanje iz cirkulacije nakon smrti ili uklanjanja embriona (Rolfe i sar.,

1984; Yamazaki i sar., 1995)

Ovi faktori ukazuju na to da bi EPF mogao biti najkorisniji u istraživanju ranog embrionalnog uginuća ili preživljavanja (Rolfe, 1982; Koch, 1986; Yamazaki i sar., 1995). Detekcija EPF se danas u potpunosti zasniva na upotrebi *rosette inhibition* testa (RIT). Ovaj test se bazira na sposobnosti anti-limfocitnog seruma (ALS) da inhibira spontano formiranje rozeta između T-limfocita i heterolognih crvenih krvnih ćelija. Ovo podrazumeva spontano formiranje rozeta od strane limfocita, rozete nalikuju cvetnom aranžmanu u kom je za limfocite prikačeno po nekoliko eritrocita. Limfociti gravidnih jedinki formiraju manje rozeta u poređenju sa negravidnim jedinkama.

Poboljšanje RIT testa u detekciji EPF je postignuto upotrebom monoklonskih antitela umesto anti-limfocitnog seruma (Yoshioka i sar., 1995). RIT test oduzima mnogo vremena i zavisi od brojnih faktora, tako da je kao alternativna metoda razvijena ukrštena imunoelektroforeza - crossed immunoelectrophoresis (CIE) (Klima i sar., 1987). Kada je reč o sprovođenju i interpretaciji CIE test je superioran u odnosu na RIT test, međutim kada je reč o preciznosti sličan je sa RIT testom (Klima i sar., 1987). Noviji rezultati pokazuju da je EPF uobičajen protein od 12kDa, tioredoksin (Clarke, 1992) ili supstanca nalik EPF 21-30kDa (Ito i sar., 1994). Ovi proteini su povišeni u cirkulaciji gravidnih jedinki i u stanju su da povise inhibicioni titar rozeta (Clarke, 1992; Ito i sar., 1994). Klima i sar., (1992) navode da aktivost bovine EPF-a može imati osobine polipeptida od 64kDa sa nepoznatom vezom sa tioredoksinom. Potrebno je još studija kako bi se potvrdili ovi rezultati. Skorije je razvijen ELISA test za dijagnostiku glikoproteinskog imunosupresiva EPF od 20kDa u serumu steonih krava. Test je mogao da dijagnostikuje graviditet kod 87.5% krava koje su gravidne ne duže od 24h, sa vidljivom promenom boje. Krave koje nisu gravidne takođe su identifikovane sa preciznošću od 87.5% (Threlfall, 1994).

Iako je EPF opisan kod životinja koje se koriste u ishrani, tehnička ograničenja RIT testa ometaju njegovu validaciju i širu upotrebu. Ovaj test ovakav kakav je danas nije praktičan za rutinsku upotrebu, novorazvijeni ELISA test bi mogao da reši ovaj problem (Threlfall, 1994).

Novi dijagnostički test, early conceptus factor (ECF) test, je razvijen u skorije vreme za primenu na terenu (Cordoba i sar., 2001, Gandy i sar., 2001). Sadašnji ECF test ne može precizno da razlikuje uspešnu od neuspešne koncepcije pre 21. dana od inseminacije.

Dijagnostika krava koje nisu steone 21 dan nakon inseminacije

Precizna dijagnostika krava koje nisu gravidne 21. dan nakon inseminacije omogućava proizvođaču da pravovremeno interveniše u smislu ponovnog osemenjavanja ili terapijanja životinje.. Precizna detekcija ne-steonosti zahteva test visoke senzitivnosti i negativne prediktivne vrednosti (Romano i sar., 2006), dok je broj lažno negativnih dijagnoza (gravidne krave koje su označene kao da nisu gravidne) nula ili minimalan. Iz tog razloga, ne postoji rizik abortusa ukoliko je tretman preporučen kod krava kod kojih je postavljena pravilna dijagnoza da nisu steone.

U novijoj studiji, neke krave koje nisu steone su već mogle biti prepoznate po odsustvu žutog tela prilikom ultrazvučnog pregleda 20 ili 21 dana od inseminacije. Sa izuzetkom jedne krave, svakoj ne-steonoj kravi je postavljena pravilna dijagnoza do 29 ili 30 dana od dana osemenjavanja (Szenci i sar., 1999). Skorija studija je ispitala preciznost transrektalne ultrasonografije (TRU) i četiri progesteronska (P4) testa iz mleka u identifikaciji ne-steonih krava 21 dan

nakon inseminacije (Karen i sar., 2012). Prijavljeno je da TRU i kvantitativni i semikvantitativni P4 testovi postižu bolje rezultate od kvalitativnih P4 testova u određivanju ne-steonih krava 21 dan od inseminacije. Krave bez žutog tela (CL), ili sa $CL < 2\text{cm}$ u dijametri, ili sa niskim P4 koncentracijama 21 dana od inseminacije (predstavljaju pola ne-steonih krava u ovih studiji) mogu biti precizno determinisane kao ne-steone pomoću TRU (transrektalne ultrasonografije) i kvantitativnih i semikvantitativnih P4 testova. U isto vreme Fricke i sar. (2003) su našli određene nedostatke u integraciji rane dijagnostike graviditeta (26 dan u odnosu na 33 dan) u program resinhronizacije, pošto je indeks koncepcije nakon inseminacije bio veći u grupi 26 dan i 33 dan u odnosu na grupu 19 dan (Resynch program je počeo 19, 26 ili 33 dana treatmentom sa GnRH).

Zaključci

Ovaj pregled je sproveden radi sagledavanja rezultata koji se postižu različitim metodama u cilju dijagnostike ranog graviditeta kod krava. Prednosti i nedostaci različitih metoda su bili predmet diskusije. Iako transrektalna palpacija uterusa predstavlja najstariji i najzastupljeniji vid dijagnostike graviditeta danas, TRU (transrektalna ultrasonografija) koja se izvodi pomoću portabl UZ aparata prihvatljive cene, mogla bi da zameni transrektalnu palpaciju kao primarni metod koji se koristi za ranu dijagnostiku graviditeta krava u skorijoj budućnosti. Testovi na prisustvo proteina (PAG, PSPB) mogu predstavljati alternativnu metodu za ultrasonografiju u determinisanju ranog graviditeta kod krava. Incidenca prekinutih graviditeta (kasna ili rana embrionalna uginuća) mogu ograničiti efikasnost mnogih indirektnih metoda za dijagnostiku ranog graviditeta na terenu, pogotovo ako se uporede sa direktnim metodama kao što su transrektalna palpacija ili transrektalna ultrasonografija. Dalja razvića moraju prevazići prethodno navedena ograničenja u cilju poboljšavanja reproduktivnih performansi.

ISPRAVKE NETOČNIH NAVODA

CORRECTION OF INACCURATE ALLEGATIONS

Gereš Darko, Špoljarić Branimira

*Klinika za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

Kratak sadržaj

U praksi se ne može opravdati nikakva izoliranost. Ukoliko je reverzibilna, zahvaljujući dostupnosti literature i informacija, može se lako kompenzirati. Naravno, poželjno je inicirati stalne susrete, razmjenu informacija i permanentnu edukaciju. Opasne su ireverzibilne nakaradnosti, fatalne po struku: autističnost, ignorancija i nerezonsko opiranje novim spoznajama. Struka i znanost grabe velikim koracima, a vlasnici životinja sve su bolje informirani. Struka je lider i valja se trajno boriti za neupitnost njenog autoriteta. Sve je determinirano, za sve postoji ime, dijagnoze su jasne, terapije strogo definirane. Nerezonski smišljati nove metode, postupke, imena ne sluti na dobro. Slijede primjeri i pitanja: Koriste se pogrešni termini (kastracija vs. sterilizacija). Da li je svejedno u kojoj fazi ciklusa sterilizirati? Ekscizija mamarnih neoplazmi mora se temeljiti na uzusima onkologije. Da li je opravdano sterilizirati u vrijeme incizije tumora? Da li je ovariohisterektomija bez medicinske indikacije indicirana? Da li je etična? Određivanje optimalnog vremena strogi je klinički protokol! Da li estrus u kuja možemo inducirati kada želimo? Što je citološka pretraga bez ginekološkog pregleda? Što se postiže jednokratnim određivanjem razine progesterona? Zar zbog ubikviternih mikroorganizama vaginalne sluznice postupati po nalogu kinologa? Da li je mačka zaista sezonski poliestrična životinja? Da li u veterinarskoj reprodukciji postoji hormonska nadomjesna terapija?

Ključne riječi: kuje, mačke, OVE, OVH, ekscizija, mamarne neoplazme, progesteron.

Summary

There is no justification for isolation in practice. If reversible, it can be easily compensated thanks to the accessible literature and information. Therefore, it is important to initiate meetings, continuous education and exchange information. Irreversible outrageousnesses are dangerous and fatal for practice: autistic behaviour, ignorance and reluctance to the new knowledge. The practice and

science are developing very fast, and the owners have good access to information. The practice is a leader, and its authority should remain unquestionable. Everything is determined, everything has its name, diagnosis are clear, therapies strictly defined. To invent new methods, procedures or names with no sense leads to no good. Here are some examples: use of wrong terms (castration vs. sterilisation). In which phase of oestrous cycle should sterilisation be done? Mammary tumor excision must be founded on oncological principles! Should the animals be sterilised at the time of tumor incision? Is there indication for ovariohysterectomy without medical reason? Is it ethical? Determination of the optimal breeding period is strictly clinical procedure! Can we induce oestrus in bitches at any time? What meaning has vaginal cytology without gynaecological examination? What do we achieve with progesteron level determination at one time only? Should we listen to dog breeders because of ubiquitous microbes in the vaginal mucosa? Is cat really seasonally polyestric? Is there really hormonal supplemental therapy in veterinary medicine?

Key words: *bitches, queens, OVE, OVH, excision, mammary gland neoplasms, progesteron.*

Uvod

Mamarne neoplazme

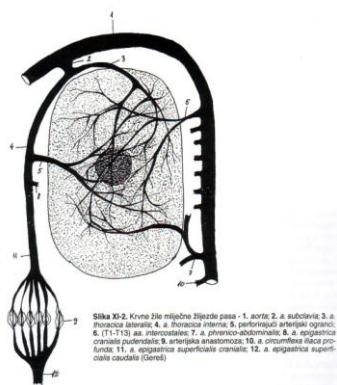
Nema sumnje da je sterilizacija kao prevencija mamarnih tumora opravdana. Naime, prosječna pojavnost mamarnih neoplazmi je 3.4%, od čega je 41-53% maligno (DeTora, 2011). Ukoliko se kuje sterilizira prije prvog estrusa rizik je svega 0.5%, što je značajno. Međutim, riječ je o hormonski uvjetovanim neoplazmama. Progesteron stimulira rast (hiperplaziju), dakle nastanak benigne transformacije normalnog tkiva. Dugotrajna izloženost tkiva estrogenizaciji uzrokuje imunosupresiju, a dugotrajna posljedična inflamacija povećava rizik nastanka tumora, pri čemu je estrogen stimulator maligne alteracije (transformacije benignog u maligni fenotip).

Sterilizacija prije 2,5 godine života umanjuje rizik nastanka mamarnog tumora. Rizik je minoran (0,5%) ukoliko je sterilizacija načinjena prije prvog estrusa, 8%-tan između prvog i drugog estrusa, a 26%-tan ukoliko je načinjena između drugog estrusa i 2,5 godine života (Schneider, 1969). Dakle, u kuja poslije 2,5 godine gubi preventijski učinak.

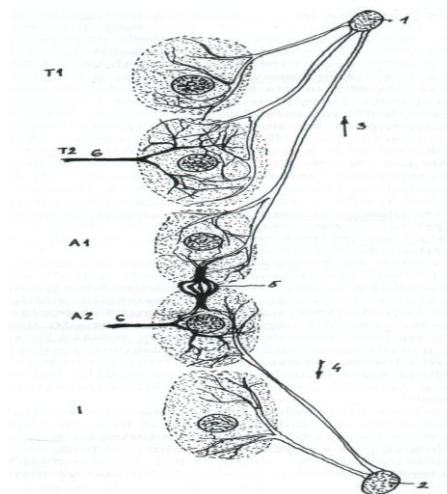
U mačaka se mamarne neoplazme u 94% slučajeva javljaju u intaktnih životinja. U steriliziranih u dobi od 6 mjeseci rizik nastanka tumora je 7 puta niži (91%) u odnosu na intaktne. Sterilizirane u toj dobi (od 6 mj. do 1 godine starosti) također statistički imaju signifikantno snižen rizik u odnosu na intaktne (86%). U mačaka steriliziranih prije i poslije prvog estrusa nema razlike u

pojavnosti mamarnih neoplazmi. Poslije prve godine života, sterilizacija gubi preventivski učinak. Međutim, sterilizacija ne štiti od pojave benignih tumora (Dorn i sur., 1968).

Posebna priča je sterilizacija u vrijeme operacije mamarne neoplazme. Prema Sorenmo-u i sur. (2000) sterilizacija u vrijeme ablacije tumora nema pozitivan učinak na duljinu preživljavanja niti negativan na razvoj tumora. U vrijeme operacije mamarne neoplazme, tkivo već ima razvijene receptore, a statistički, vrijeme preživljavanja nije bolje nakon te operacije. Dapače, to je trauma više prilikom operacije tumora, a s druge strane na taj način bez sumnje otvaraju se novi krvožilni i limfogeni putevi širenja metastaza (Yamagami i sur.,1996a; Yamagami i sur.,1996; Morris i sur., 1998; Philibert i sur., 2003). Primjerice, dvije epigastrične arterije anastomoziraju u području pupka, a žilice prodiru kroz prsnu stijenku na kontralateralnu žlijezdu. Još veću važnost u širenju metastaza ima limfni sustav koji stvara komunikaciju između lijevih i desnih te prednjih i stražnjih mliječnih žlijezda i aksilarnih i ingvinalnih limfnih čvorova kao primarnih metastatskih lokacija. Svaka žlijezda ima mrežu limfnih žilica, u papilama spojenih sa sličnima iz subkutisa i parenhima i na taj je način kompletno područje žlijezde okruženo. Žilice konfluiraju čineći veće duktuse koji komuniciraju s kanalima limfne mreže susjedne žlijezde ili lokalnog limfnog čvora (Gereš, 2002). Iznimka je ukoliko u vrijeme ablacije tumora nije jasno radi li se o malignoj ili benignoj proliferaciji. U tom slučaju autori smatraju sterilizaciju dobrim postupkom (Sorenmo i sur., 2000; Chang i sur., 2005) zbog visokog postotka estrogen-pozitivnih tumora u kuja.



Slika 1. Anastomoza epigastričkih arterija u području pupka (Gereš, 2002)



Slika 2. Limfožilje mliječne žlijezde (Gereš, 2002)

Zašto kod mamarnih neoplazmi biopsija nije indicirana?

Citologija u mamarnih tumora često je nezahvalna zbog moguće istodobne upale ali i velike vjerojatnosti da će mamarni tumor, temeljem citološkog nalaza, biti histopatološki blag, a uprkos tome invazivne naravi. **To je razlog** zašto u interpretaciji mamarnih neoplazmi patohistološka TNM (pTNM) klasifikacija nema praktičko značenje i nikako nije reprezentativna u ocjeni naravi tumora. Glavna indikacija za obavljanje citologije u mamarnoj regiji jest namjera da se isključi druga patologija u slučaju mastocitnih tumora (MCT, mast cell) ili drugih lezija kao i sumnje da se radi o upalnim tumorima koji su nonoperabilni (Allen i sur, 1986). FNA biopsija može biti neuvjerljiva, a rezultati ni u kom slučaju neće nas odvratiti od agresivnije kirurške ekscizije. **Osim toga**, zahvat može biti izveden na krivoj poziciji. Naime, mamarni tumori su ekstremno heterogeni (mješoviti) i zaključak će u pravilu usmjeravati prema dominantnim upalnim promjenama pri čemu se zanemaruju karakteristike maligniteta. Stoga biopsat nije reprezentativan. Važan je razlog opasnost od agresivne invazivnosti tumora. dakle biopsijom razaramo kapsulu i stvaramo okružje za širenje metastatskih nodula. Nikad se kod procjene kliničkog stadija ne smije oslanjati na rezultat jedne biopsije, osim ako prvi rezultati dokazuju dominantni malignitet. Citološki je potrebno pretražiti eventualni abnormalni sekret, kako bi se diferencijalnodijagnostički isključio mastitis. Također se može pretražiti tkivo iz ulceriranih područja na površini tumora. U načelu, izvodi se uvijek ekscizija, a aspiracijska biopsija tankom iglom (FNAB) rijetko. Probatorna ekscizija dijela tumora ne dolazi u obzir jer se time razara kapsula i tkivo tumora, čime se uzrokuje krvarenje ali i stvaraju idealni uvjeti za metastaziranje (Morrison, 1998; Gereš, 2002).

Vjerojatno je, zbog velike senzibilnosti (točnosti) probitačna FNAB regionalnih limfnih čvorova u dijagnostici metastaza, što ima logike, budući su metastaze u regionalnim limfnim čvorovima homogene (Gereš, 2002; Pankaj i Raghunath, 2010).

Tabela 1. Heterogenost tumora mliječne žlijezde

Tablica XI-3. Patološkohistološka klasifikacija tumora mliječne žlijezde pasa (Zavod za patologiju i patološku morfologiju; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

I. EPITELNI TUMORI
A. benigni (dobročudni ili naizgled dobroćudni)
1. adenomi; papilarni ili papilarni cistadenomi tubularni složeni (sl. XI-7.)
B. maligni
1. adenokarcinomi; tubularni ili papilarni cistadenokarcinomi jednostavni (sl. XI- 8. i XI-9.) složeni
2. solidni karcinomi jednostavni (sl. XI-10.) složeni
3. karcinomi vretenastih stanica jednostavni složeni
4. anaplastični karcinomi
5. mucinozni karcinomi
6. planocelularni karcinom
II. MEZENHIMSKE NEOPLAZME
A. benigni
fibromi
osteomi
kondromi
lipomi
B. maligni
fibrosarkomi
osteosarkomi
kondrosarkomi
III. MJESOVITE NEOPLAZME
A. benigni mješoviti tumori
B. maligni mješoviti tumori

Sterilizacija/kastracija

Neutering (gonadektomija), od Latinskog *neuter* (ni jedan od dvojice, Marević, 2000) znači uklanjanje reproduktivnih organa, cijelih ili velikog dijela. Termin se koristi za muške životinje, dok se za ženke rabi termin *spaying* (štrogenje). Tehnički, za mužjake se koristi termin kastracija. To znači uklanjanje muških gonada, testesa, izvora testosterona. U ženki se štrogenje izvodi abdominalnom kirurgijom uz uklanjanje jajnika (ooforektomija, ovariotomija, ovariektomija) ili jajnika i maternice (hystero-oophorectomy, ovariehisterektomija, ovariohisterotomija). Testosteron bitno utječe na mozak psa najmanje u dvama fazama razvoja, prenatalno i u vrijeme spolnog dozrijevanja. U maternici majke testosteron difundira transplacentalno i trajno determinira tipično muško ponašanje koje se manifestira prije spolne zrelosti. U drugoj fazi, u adolescenciji, formira anatomske promjene maskulinizacije. Štrogenje (*spaying*) je kirurško uklanjanje ovarija (i/ili uterusa) izvora estrogena i progesterona u ženki (Hart i Eckstein, 1997). Kao i većina autora, tako i Howe (2001) govori o sterilizaciji, točnije za ženske životinje koristi termin ovario(histerektomiji), a kada govori o muškim životinjama koristi termin kastracija ili gonadektomija.

Da li kastracija ženskih životinja. Ne!! O tome bolje ne! To je dobar dokaz kako internetske laičke diskusije (bez dokaza, literature i sl.) mogu steći snagu znanstvenog argumenta. Populističkim prostačenjem, nadglasavanjem, decibelizacijom čak i stručnjaci se ponašaju u stilu ("tako je i gotovo"). Ne znam što je gore. Da li opcija po kojoj laici nameću termin, a stručnjaci ga prihvaćaju, ili

da stručnjaci koriste pogrešni termin pa onda tako govore i laici. I...koji je najjači internetski argument? „Tako je rekao dr“.

Ovariektomija versus ovariehisterektomija

Gonadektomija se može izvesti ovariektomijom (OVE) ili ovariohisterektomijom (OVH) (Fingland, 1998; Stone i sur., 1993; Hedlund, 1997a; Hedlund, 1997b). U SAD se preferira OVH uz obrazloženje da se time prevenira moguća patologija maternice, pa je OVH generalno prihvaćena metoda sterilizacije. Logičnijim se čini (još uvijek) europski pristup po kojem se uterus uklanja samo ako je indicirano, tj. ako je riječ o patologiji, prvenstveno u vidu aberantnih estrusnih manifestacija. To je i logično, jer je OVE načelno operacija izbora, a OVH se izvodi temeljem indikacije (Okkens i sur., 1981a; Okkens i sur., 1981b; Janssens i Janssens, 1991; Okkens i sur., 1997). Premda dugotrajni nuzučinci (posljedice) OVH nisu drugačiji nego kod OVE, ovariotomija podrazumijeva kraće trajanje operacije, manji rez i manju abdominalnu traumu. Teško je reći da je pravilo, ali u literaturi svi podaci govore o inkontinenciji urina (naravno, poslijeoperativnoj, hormonski uvjetovanoj) u kuja kao posljedici ovariohisterektomije, a ne ovariektomije. Danas već i veterinari u SAD razmišljaju o prednostima OVE pred OVH jer i sami, razmatrajući determinaciju između dvije metode, zaključuju da je OVH tehnički kompliciranija, operacija dulje traje, vezana je uz viši morbiditet komplikacija (veći rez, više intraoperativnih trauma, i povišena traumatizacija kuja) u odnosu na OVE, premda nisu uočene razlike u incidenciji urogenitalnih problema (piometra, inkontinencija), u zdravih kuja (Howe 1997; van Goethem i sur., 2006; Howe 2009).

OVE je preporučljiva za elektivnu sterilizaciju, načelno se ne izvodi temeljem indikacije ali je svrsishodna, a u rijetkim slučajevima medicinski indicirana. Primjerice, za liječenje tumora jajnika, za indukciju involucije (kada je izostao učinak medikamentata), u prevenciji reverzibilne hiperplazije vagine u (sljedećem) estrusu, prevenciji hormonskih nuzučinaka koji interferiraju sa terapijom primarne bolesti (npr. dijabetes) te u prevenciji nasljednih osobina pacijenata sa endokrinim bolestima (generalizirana demodikozna). Naravno, preporučljiva je u mladih kuja kao prevencija mamarnih neoplazmi (Schneider i sur., 1969; Berzon, 1979; Okkens i sur., 1981a; Okkens i sur., 1981b; Janssens i Janssens, 1991; Stone i sur., 1993; Hedlund, 1997; Okkens i sur., 1997; Fingland, 1998; Stone, 2003).

Najsmješnija su tumačenja autora ali i internetskih šaljivdžija po kojima se ovariohisterektomijom preveniraju tumori jajnika i maternične infekcije te maternične neoplazme. Njihova snaga danas je tolika da javno, preko informativnih medija „ispravljaju“ one koji tobože manje znaju od njih i na taj način, silom „guraju“ neistine. To je Pirova pobjeda nelogičnosti i neznanja. Njih

treba uvjeriti u suprotno činjenicama, što je u ovom slučaju teško. Ujedno, ima primjera kako čak i literatura može štetno utjecati.

Od svih neoplazmi uterusa, samo je 30% teratoma, 10-30% disgerminoma i 10%-20% granuloza tumora maligno (Cotchin, 1959; Cotchin, 1961; Dehner i sur., 1970; Andrews i sur., 1974; Nielsen i sur., 1976; Hayes i Harvey, 1979; Herron, 1983; Patnaik i Greenlee 1987; Nielsen, 1990). Premda su opisani u svih domaćih životinja tumori jajnika su izuzetno rijetki. Prema Dow-u (1960) incidencija tumora ovarija u kuja je 6,3%. Međutim, to treba uzeti s rezervom zbog velikog broja steriliziranih kuja u SAD, pa se prema preciznijim istraživanjima ona kreće od 0,5-1,2%. U pravilu se javljaju u starijih životinja i prosječna je dob u kojoj su dijagnosticirani 10-12 godina. Iznimka su teratomi koji se dijagnosticiraju u dobi ispod 6 godina, a u mačaka su ustanovljeni čak i u dobi ispod 2 godine. U pravilu su unilateralni (Cotchin, 1959; Cotchin, 1961; Brodey, 1970; Hayes i Harvey, 1979; Herron, 1983; Gelberg i McEntee, 1985; Wilson i sur., 1985; Anderson, 1986; Jergens i Knapp, 1987; Patnaik i Greenlee 1987). Većina tumora jajnika razvija se iz jednog od tri tipa tkiva (epitela, stromalnih stanica ili germinativnih stanica) najčešće prva dva navedena. Stromalni su funkcionalni, tj. produciraju estrogen ili progesteron, rjeđe testosteron. Granuloza stanični tumori su najčešći stromalni i više od 70% ih je funkcionalno (Cotchin, 1961; Herron, 1983; Patnaik i Greenlee 1987; McEntee, 1990). Adenokarcinomi i nediferencirani karcinomi metastaziraju stvarajući maligne pertonealne efuzije (Amand i sur., 1970; Greene, 1979; Olsen, 1994; McEntee, 1990). U liječenju je indicirana kompletna ovariohisterektomija uz adjuvantnu terapiju i kemoterapiju (Greenlee i sur., 1979; McKee, 1985; Patnaik i Greenlee 1987; Moore i sur., 1991). Međutim, postavlja se pitanje zašto u prevenciji OVH kada i OVE ispunjava osnovna dva uvjeta: uklanjanjem samo jajnika (bez maternice) prevenira se apriori nastanak tumora, a shodno tome i masivnu endokrinu produkciju.

Zaključak: ovariotomija prevenira nastanak tumora jajnika, tim više što se provodi u ranijoj dobi. U tom slučaju rizik razvoja tumora ovarija (obzirom na razvoj tumora u poodmakloj dobi) praktično ne postoji.

Čak i veliki autori znaju pisati onako kako se pisati ne smije-bez argumenata i bez citiranja autora. Primjeri su za to Feldman-a i Nelson-a (2004) koji neargumentirano pišu da ovariektomija ostavlja uterus koji je mjesto potencijalne infekcije, premda u nastavku kažu da OVE (kao dio OVH) reducira rizik mamarnih neoplazmi ako je načinjena prije prvog estrusa (Schneider, 1990).

Maternične infekcije neće nastati ako se operacija izvodi lege artis po pravilima struke i antiseptice. Što se nastanka tumora maternice tiče, oni su raritet u pasa i u mačaka. U pasa predstavljaju 0,3-0,4% svih tumora, a u mačaka 0,2-1,5%. Najčešći su leimiomi, koji su u 85-90% slučajeva benigni, dok su ostali su samo registrirani. Leimiomi su možda hormonski uvjetovani, premda uporaba progestina ne povećava rizik (za razliku od žena). Povišen je rizik u debelih kuja i

u nulipara, a jedino je u njemačkih ovčara ustanovljena genetička predispozicija. Kirurško uklanjanje rezultira odličnom prognozom (Klein, 1996; Vollenhoven (2005). Navodno medicinsko opravdanje prevencija je uterinih neoplazmi. Ali, svega je 0.003% maligno i valja ih liječiti ovariehisterektomijom, ali uz prethodnu pripremu ovariektomije (DeTora i Mc Carthy 2011). Isti autori tvrde da u literaturi nije opisan niti jedan slučaj uterine neoplazme u kuja kojima su ovariji uklonjeni prije druge godine života, što govori o bespotrebnosti OHV. Primjer je i opažanje (Gereš, 2013) u 12 kuja. Tijekom pokusa one su ovariotomirane. Mjesec dana poslije operacije, u istih kuja bilo je potrebno uzeti male uzorke tkiva uterusa. Maternice u svih kuja bile su atrofirane u tolikom stupnju da ih je bilo izuzetno teško izdiferencirati i evakuirati iz abdomena. Stupanj atrofije bio je iznenađujući, ali logično obrazloženje se nameće. Nije bilo hormonske produkcije. Shodno, pitanje pametnjakovićima je: Kako se iz takve maternice može razviti neoplazma ili infekcija? Iako u literaturi nema podataka o prednosti OVE pred OVH logičan je zaključak da američko opredjeljenje nije temeljeno na argumentima. Kao zaključak valja navesti konstataciju da je nesumnjivo nepotrebn izbor OVH pitanje novca, znači automatski i etičko pitanje. Ako nije etičko, tada je stvar neznanja, pomodnosti, samodokazivanja, nerazumijevanja ili slijepe amerikanizacije. U kirurgiji ipak valja voditi računa da je uvijek na prvom mjestu dobrobit pacijenta (Bojrab,1998; Fossum, 2002).

Mikroorganizmi porođajnog kanala zdrave kuje u estrusu

Preventivna analitika bakteriološke flore efektan je (za laike) postupak ispiranja sluznice, kao jedna strana gluposti. Objava opće opasnosti za parenje je katastrofa. To je tipičan primjer kako je struka „popušila“ od kinologa, laika, ili kako mi znamo kazati, primjer da se pacijent ne liječi nego „servisira“. Podilaženje ali i neznanje ipak imaju granice. Dakle, preventivno se u zdravih kuja ne uzima mikrobiološki bris sluznice vagine prije parenja, a pogotovo ih se ne terapeuta antibioticima kod nalaza ubikvitarnih uzročnika. Kuje sa iscjerkom ionako nećemo pariti, a liječenje ne bismo smjeli poduzeti prije ili bez kliničkog pregleda.

Kolege se opravdavaju da to rade zbog pritiska. Pa ne možemo podleći pritisku pa svaku oportunu bakteriju iz vaginalnog brisa kuje proglasiti fatalnom. Sluznica nije pinceta pa da je steriliziramo. I samom mi je poznato kako se vasci uvrijede kada ne želite učiniti kako su zamislili ili čuli savjet nekog „iskusnog“ uzgajivača. Traže uzorkovanje i bakteriološku analizu brisa kao preduzgojni pregled i naravno, očekuju 'negativnu' kulturu. Time sami sebi režemo granu, jer praktički ne postoji sterilna kultura, a interpretacija nalaza je više nego upitna. Kakve rezultate možemo očekivati? Prema istraživanju Bjurström-a i Linde-Forsberg-a (1992), svega 5,2% sluznica vagine kuja je mikrobiološki negativno, što nesumnjivo znači da uzorkovanje brisa rodnice u zdravih kuja nema smisla.

Samo u 18% slučajeva izolirane su čiste kulture (mada i to ne znači da se radi o uzročnicima bolesti), a sve ostale kuje (od 826 uzoraka) bile su pozitivne i to sa mješovitom bakterijskom florom. Bakterijsku floru vagine (uključujući *Mycoplasma* spp.) vagine u kuje, najčešće čine *Escherichia coli*, pa redom *Streptococcus 'viridans'*, potom *Staphylococcus aureus* te *Streptococcus*. Interesantno da je sastav eksudata (vaginalnog iscjetka) u kuja sa poremećajem ciklusa sadržava sličnu bakterijsku floru (redom: *E. coli*, pa *Strep. canis* i *Staph. aureus*). Najbitnija razlika u flori iz ta dva izvora jest što patološki eksudat sadrži veći broj bakterija (Dwight i sur., 1977). Valja voditi računa da se stanje mijenja u estrusu, ali i shodno fazi ciklusa. Tako je bakterijski rast, (ali ne i vrste bakterija) puno jači u estrusu nego anestrusu. Allen i Dagnall (1982), Watts i sur. (1996), proučavali su bakterijsku floru (aerobnu, anaerobnu i aerobne mikoplazme) uterusa zdravih kuja (transcervikalnom kanilom), i uterusa, cerviksa i vagine post mortem, u svim fazama ciklusa. Bakterije su bile prisutne u maternici uvijek tijekom proestrusa i estrusa, izuzetno rijetko u ostalim stadijima, a uopće ih nije bilo u anestrusu. Zastupljenost je redom bila kako slijedi: *Escherichia coli*, *Haemophilus species*, α -haemolitički streptokoki, *Corynebacterium species*, *Streptococcus canis*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacteroides species*, *Pasteurella species* i *Proteus mirabilis*, a mikoplazmi nije bilo. Iz toga je razvidno da su uterus, cerviks i vagina zdravih kuja u pravilu u proestrusu i estrusu kontaminirani bakterijama.

Besmisleno je profilaktički terapijirati. Ström-a i Linde-Forsberg-a (1993) proučavali su aerobnu floru 5 zdravih kuja tijekom 10 dana terapije ampicilinom i jednako tako sa trimethoprim-sulfametoksazolom (uz prethodnu mikrobiološku analitiku). Sve su kuje imale bakterijama koloniziranu sluznicu i u svih su, već nakon prvog dana tretmana, bakterije eradikirane (pasterele, streptokok i (osim u jednom slučaju) *E.coli* i *Staphylococcus intermedius* bilo je teže eradikirati. U 4 od pet kuja tretiranih ampicilinom, nakon 4 dana, a u kuja tretiranih trimethoprim-sulfametoksazolom, već nakon 3 dana, nastupila je opet bakterijska kolonizacija. Iako mikoplazme mogu biti patogene za genitalni trakt, a i *E. coli* je često uropatogena, njihova ponovna kolonizacija argument je protiv raširene upotrebe antibiotika u zdravih kuja, ali i dokaz da one ne moraju apriori biti patogene. Dakle, bakterijska kultura brisa sluznice rodnice unosi više konfuzije i često je nemoguće pravilno interpretirati, a svakako je ne bi trebalo raditi bez kliničkog pregleda.

Još o nakaradnostima. U knjigama! Kinološkim! Septikemija je glavni uzrok uginuća u štenaca i mačića tijekom prva tri tjedna života. Kod poroda štenci i mačići su u imunokompromitiranom statusu, što znači da su prijemčivi za bakterijske infekcije uzročnicima koji fiziološki koloniziraju površine sluznica i kože. Uprkos izvjesnoj transplacentalnoj pasaži imunoglobulina, što ih uspješno ih brani od infekcija, novorođenčad ovisi o pasivnom imunitetu koji primaju tijekom 1. i 2. dana života. Također je važan i urođeni imuni mehanizam koji

održava zdravlje sluzničkih površina (Daniels i Spencer, 2011). To ipak ne znači da bi sluznice trebalo spaliti letlampom kako bi bile sterilne.

Pretraga progesterona

Diestrus (lutealna faza) počinje kada kuje više ne prihvaćaju mužjaka (od završetka estrusa). U razdoblju kroz 10-30 dana nakon preovulatornog porasta LH razina progesterona, podrijetlom od CL, naglo raste. U negravidnih kuja traje nešto dulje od dva mjeseca i obično oko 75. dana pada na najnižu, bazalnu razinu (prosječno 0,315 ng/ml ili niže) (Schaefers-Okkens, 2010).

Početak *anestrusa* je završetak lutealne faze. Tada razina progesterona pada ispod bazalne (<1 ng/mL) (Blendinger, 2007).

Proestrus. U početku folikularne faze (*rani proestrus*) progesteron je nizak (ispod bazične razine (>0,2ng/ml). Od *srednjeg proestrusa* počinje fluktuirati i rasti (od bazičnog 0,2 do 0,6 ng/ml). U drugoj polovici folikularne faze (*kasni proestrus*-početak fluktuacije LH) raste od 0,9 do 3,0 ng/ml kroz prva 12-24 sata (De Gier i sur, 2006).

Estrus. U sljedeća dva dana koja prethode ovulaciji (vrijeme preovulatornog porasta LH) penje se na 2-5 ng/ml. U vrijeme ovulacije, ili još češće 36-48 sati poslije ovulacije, razina progesterona raste obično na 3-8 ng/ml (Concannon, 1986; Blendinger, 2007). Šestog dana poslije LH peaka koncentracija iznosi 6-12 ng/ml, kao rezultat parcijalne luteinizacije granulosa stanica.

Postupak određivanja optimalnog vremena za parenje/inseminaciju počinje općom kliničkom pretragom, a poslije slijedi specijalistička, ginekološka pretraga. Pretraga se ponavlja svaki dan kako bi se odredio termin ali i kako bi se ustanovilo da li se sve odvija normalno (Schaefers-Okkens i Kooistra, 2009).

Pretragu progesterona usporedo sa drugim pretragama trebalo bi ponavljati svaki dan. Koncentracija progesterona treba postupno rasti počev od preovulatornog LH, a potom rapidno do početka ovulacije kada iznosi 1-8 ng/mL (Blendinger, 2007).

Optimalno vrijeme za parenje je 24 sata kasnije, temeljeno na vremenu potrebnom za maturaciju oocite, kapacitaciju i vrijeme života spermija (Mahi i Yanagimachi, 1976; Reynaud i sur, 2005).

Zašto nije dostatno načiniti samo jednu progesteronsku probu i zašto ne bez kliničke pretrage i bez citološke pretrage? Iz jednostavnog razloga što u vrijeme preovulatornog porasta LH, koncentracija progesterona naglo raste u jednom intervalu (vjerojatno u intervalu koji prati ovulaciju) i nadolazeću luteinizaciju CL. To razdoblje je varijabilnog trajanja i u njemu razina progesterona može ostati nepromijenjena kroz 3-4 dana (Wildt i sur, 1978;

De Gier i Kooistra 2006), što ujedno govori da mjerenje razine preovulatornog LH u kuja nije pouzdano. Nagli porast progesterona može biti bolji marker ovulacije nego razina LH. Zašto citološka pretraga? Zato jer u fazi kada kroz dan ili dva nema promjena tipičnog nalaza citologije, što je znak preovulatornog porasta LH ili ovulacije. Požuda u pravilu nastupa 1 dan nakon LH peaka (preuranjeno 1-3 ili zakašnjelo 1-4 dana) (Hiemstra i sur, 2001).

Kretanje razine progesterona po fazama spolnog ciklusa

	Trajanje	Progesterona (ng/ml)	Opaska
Anestrus	1-6 mjeseci	Bazalna (<1 ng/mL)	
Proestrus	3 dana-3 tjedna (prosječno 9 dana)	Inicijalna bazalna (<1 ng/mL); Za preovulatornog LH: 2-3 (0,8-3) ng/mL Na dan ovulacije: 4-10 ng/ml (ovulacija: obično 1-8 ng/mL)	
Estrus	3 dana-3 tjedna (prosječno 9 dana)		Primarne oocite ovuliraju 2 dana nakon LH peaka. Maturacija oocita završava 2-3 dana kasnije. Sekundarna oocita živi 2-3 dana.
Diestrus	2-3 mjeseca	Najviša vrijednost 15-80 ng/mL (u negravidnih kuja)	

Kada se cijeli postupak određivanja optimalnog vremena parenja/inseminacije svede isključivo na (jednokratnu) pretragu progesterona nemoguće je točno odrediti dan inicijalnog porasta i odijeliti ga od stvarnog fertilnog razdoblja. Takva rutina znači u najmanju ruku prihvaćanje visokog rizika pogreške, posebice ako se radi o brzim kliničkim testovima. S druge strane, u korištenju usluga laboratorija valja voditi računa da humani laboratoriji obično nisu upućeni u veterinarsku problematiku, dakle nisu ekipirani za vrstu-pas. Ako se nažalost već rutuinski, bez pregleda i citološke pretrage pokuša odrediti optimalno vrijeme rasplodivanja, onekle pouzdan je sljedeći postupak: oprez počinje kada je razina progesterona > 2ng /ml. Uvijek 2-4 dana nakon tog prvog porasta, novi sljedeći porast bit će koliko-toliko upotrebljiv pokazatelj.

Analiza moguće pogreške

Parenje se preporuča kada je razina progesterona 1-8 ng/ml.

Kasni proestrus 0,9 do 3,0 ng/ml

U sljedeća dva dana koja prethode ovulaciji (*vrijeme preovulatornog porasta LH*) razina raste na **2-5 ng/ml**.

U vrijeme *ovulacije*, ili još češće *36-48 sati poslije ovulacije*, razina progesterona raste obično na **3-8 ng/ml** (Concannon, 1986; Blendinger, 2007).

Šestog dana poslije LH peaka koncentracija iznosi **6-12 ng/ml**, kao rezultat parcijalne luteinizacije granulosa stanica.

Što se nameće? Ako se parenje preporuča pri razini progesterona od 1-8ng/ml tada je mogućnost pogreške nesumnjivo velika jer vrijednosti unutar navedenog raspona se javljaju više puta. Znači pretraga razine progesterona, posebice jednokratna, bez ginekološkog pregleda i citološke pretrage gotovo da je beskorisna i nosi veliku vjerojatnost pogreške.

Hormonska nadomjesna terapija

Sintagma koja podrazumijeva nadomjesno liječenje žena u menopauzi estrogenim hormonima, kako bi se prevenirali simptomi menopauze, osteoporoza i ateroskleroza. Trećina postmenopauzalnih žena u SAD koristi hormone za HRT (hormone replacement therapy) u liječenju simptoma menopauze i za prevenciju kroničnih bolesti. Uprkos tako raširenoj primjeni nema dokaza o korisnosti u prevenciji kroničnih stanja (Nelson 2002, Nelson i sur. 2002).

Da li u veterinarskoj medicini postoji u tom smislu nadomjesna terapija? Ako primijenjujemo estrogene zato što je kuja sterilizirana, onda se postavlja pitanje zašto je sterilizirana. Pa vjerojatno i zato da bismo prevenirali estrusno ponašanje. Da li ćemo u tom smislu nešto postići? Naravno da nećemo. Jer, nema jajnika, znači nema ni FSH i LH receptora. Znači nema povratne sprege. Estrogen ničemu ne služi osim mokrenju.

Estrogenska nadomjesna terapija kao prevencija inkontinencije. To se ne može prevenirati jer se radi o degenerativnom procesu koji, grubo rečeno nastaje zbog izostanka ciklusa. Estrogen u terapiji hormonski uvjetovane inkontinencije je u redu, ali to je terapija, a ne prevencija.

Literatura:

1. Allen WE, Dagnall GJR, 1982, Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch, *Journal of Small Animal Practice*, 23, 325-35.
2. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey, 1986, Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors, *Vet Pathol*, 23, 649.
3. Anderson GL, 1986, Granulosa cell tumor in a dog, *Compend Contin Educ*, 42 (21), 8158-64.

4. Berzon J, 1979, Complications of elective ovariohysterectomies in the dog and the cat at a teaching institution: clinical review of 853 cases, *Vet Surg*, 8, 89-91.
5. Blendinger K, 2007, Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch 56° *Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Proceedings*, Rimini, Italy, 73-7.
6. Bojrab JM, 1998, Ovariohysterectomy. In: Bojrab JM, editors, *Current Techniques in Small Animal Surgery*, Baltimore:Williams and Wilkins, 489-99.
7. Bridgefor E, Marini RP, Feng Y, Parry NMA, Rickman Fox JB, 2008, Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis, *Vet Immunol Immunopathol*, 123, 106-13.
8. Brodey RS, 1966, Alimentary tract neoplasms in the cat: a clinicopathologic survey of 46 cases, *Am J Vet Res*, 27, 74-80.
9. Brodey RS, 1970, Canine and feline neoplasia, *Adv Vet Sci Comp Med*, 14, 309-54.
10. Brunnert SR, Dee LA, Herron AJ, Altmanet NH, 1992, Gastric extramedullary plasmacytoma in a dog, *J Am Vet Med Assoc*, 200, 1501-2.
11. Bjurström L, Linde-Forsberg C, 1992, Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am J Vet Res*, 53(5), 665-9.
12. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML, 2005, Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002), *J Am Vet Med Assoc* 227(10), 1625-9.
13. Cohen M, Post GS, Wright JC, 2003, Gastrointestinal leiomyosarcoma in 14 dogs, *J Vet Intern Med*, 17, 107-10.
14. Concannon PW, 1986, *Canine physiology of reproduction*. In: Burke TJ, editor, *Small animal reproduction and infertility*, Philadelphia, Lea and Febiger, 23-42.
15. Cotchin E, 1959, Some tumours of dogs and cats of comparative veterinary and human interest, *Vet Rec*, 71, 1040-50.
16. Cotchin E, 1961, Canine ovarian neoplasms, *Res Vet Sci*, 2, 133-42.
17. Daniels J, Spencer E, 2011, Bacterial Infections. In: Peterson ME, Kutzler MA, editors, *Small Animal Pediatrics*, Missouri: Elsevier, Saunders, 113-18.
18. DeGier J, Kooistra HS, Djajadiningrat-Laanen SC, DielemanSJ, Okkens AC, 2006: Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin and alpha-melanocyte stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* 65, 1346-59.
19. Dehner LP, Norris HJ, Garner FM, Taylor HB, 1970, Comparative pathology of ovarian neoplasms. III. Germ cell tumors of canine, bovine, feline, rodent and human species, *J Comp Pathol*, 80, 299-06.
20. Dennis MM, Bennet N, Ehrhart EG, 2006, Gastric adenocarcinoma and chronic gastritis in two related Persian cats, *Vet Pathol*, 43, 358-62.

21. DeTora M, McCarthy RJ, 2011, Ovariohysterectomy versus ovariectomy for elective sterilization of female dogs and cats: is removal of the uterus necessary? *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239 (11), 1409-12.
22. Dorn CR, Taylor DON, Schneider R, 1968, Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County, *J Natl Cancer Inst*, 40, 307-18.
23. Dow C, 1960, Ovarian abnormalities in the bitch, *J Comp Pathol*, 70, 59-69.
24. Dwight D, Hirsh, Wiger N, 1977, The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates, *Journal of Small Animal Practice*, 18(1), 25-30.
25. Feldman EC, Nelson RW, 2004, Induced Abortion, Pregnancy Prevention and Termination, and Mismating. In: Feldman EC, Nelson RW, editors, *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Missouri: Saunders, Elsevier, 835-51.
26. Florito DA, 1992, Hyperestrogenism in bitches, *Compend Contin Educ* 14, 727.
27. Fitzgerald KT, Newquist KL, 2011, Husbandry of the Neonate. In: Peterson ME, Kutzler MA, editors, *Small Animal Pediatrics*, Missouri: Elsevier, Saunders, 44-52.
28. Fonda D, Gualtieri M, Scanziani E, 1989, Gastric carcinoma in the dog: a clinicopathological study of 11 cases *J Small Anim Prac*, 30, 353-60.
29. Fingland RB, 1998, Ovariohysterectomy, In: Bojrab MJ, editor, *Current Techniques in Small Animal Surgery*, Baltimore: Williams & Wilkins, 489-96.
30. Fossum TW, 2002, Ovariohysterectomy and Orchiectomy, In: Fossum TW, editor, *Small Animal Surgery*, St. Louis, Mosby, St. Louis, 616-22.
31. Gelberg HB, McEntee K, 1985, Feline ovarian neoplasms, *Vet Pathol* 22, 572-86.
32. Gereš D, 2013, Usmeno priopćenje.
33. Gereš D, 2002, Tumori mliječne žlijezde u pasa. In: Grabarević Ž, editor, *Veterinarska onkologija*, Zagreb: DSK-FALCO, 455-73.
34. Grabarević Ž, 2002, Biologija i morfologija tumora. In: Grabarević Ž, editor, *Veterinarska onkologija*, Zagreb: DSK-FALCO, 90-5.
35. Greene JA, Richardson RC, Thornhill JA, Boon GD, 1979, Ovarian papillary cystadenoma carcinoma in a bitch: case report and literature review, *J Am Anim Hosp Assoc*, 15, 351-6.
36. Hart BL, Eckstein RA, 1997, The role of gonadal hormones in the occurrence of objectionable behaviours in dogs and cats, *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 331-44.
37. Hayes A, Harvey HJ, 1979, Treatment of metastatic granulosa cell tumor in a dog, *J Am Vet Med Assoc*, 174, 1304-6.

38. Hedlund CS, 1997a, Surgery of the reproductive and genital systems, In: Fossum TW, editor, *Small Animal Surgery*, St.Louis: Mosby MO-Year Book Inc, 523-4.
39. Hedlund CS, 1997b, Surgery of the reproductive and genital systems. In: Fossum TW, editor, *Small Animal Surgery*, St.Louis: Mosby MO-Year Book Inc, 536-7.
40. Herron MA, 1983, Tumors of the canine genital system, *J Am Anim Hosp Assoc*, 19, 981-94.
41. Hiemstra M, Schaeffers-Okkens AC, Teske E, Kooistra HS, 2001, The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. *Tijdschr Diergeneeskunde* 126, 685-9.
42. Howe LM, 1997, Short-term results and complications of prepubertal gonadectomy in cats and dogs, *J Am Med Vet Med Assoc*, 211, 57-62.
43. Howe LM, Slater MR, Boothe BW, Hobson HP, Holcom JL, Span AC, 2001, Long-term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditional age in dogs, *J Am Vet Med Assoc*, 218(2), 217-21.
44. Howe LM, 2009, Early-Age Neutering in the Dog and Cat. In: Bonagura JD, Twedt DC, editors, *Kirk's Current Veterinary Therapy*, Missouri: Saunders, 1019-24.
45. Janssens LA, Janssens GH, 1991, Bilateral flank ovariectomy in the dog – surgical technique and sequelae in 72 animals, *J Small Anim Pract*, 32, 249-52.
46. Jergens AE, Knapp DW, Shaw DP, 1987, Ovarian teratoma in a bitch, *J Am Vet Med Assoc*, 191, 81-3.
47. Klein MK, 1996, Tumors of the female reproductive system. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors, *Small animal clinical oncology*, Philadelphia, Saunders, 347-55.
48. Lethaby A, Vollenhoven B, (2005, Fibroids (uterine myomatosis, leiomyomas), *Am Fam Phys*, 71, 1753-56.
49. Mahi CA, Yanagimachi R, 1976, *J Exp Zool*, 196, 189-96.
50. Marević J, 2000, Neuter, In: Marević, J. editor: *Latinsko-hrvatski enciklopedijski rječnik*. Zagreb: Marka, Matica hrvatska, 2034.
51. McEntee K. 1990, Reproductive pathology of domestic animals. In: McEntee, editor, *Reproductive pathology of domestic animals*, San Diego: Academic Press.
52. Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell MVB (1998): Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms, *Vet Rec*, 142, 656-8.
53. Morrison WB, 2004, Canine and Feline Mammary Tumors. In: Cann, editor, *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*, Baltimore, Williams & Wilkins.

54. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD, 2002, Postmenopausal Hormone Replacement Therapy Scientific Review, *JAMA*, 288(7), 872-81.
55. Nelson HD, 2002, Assessing Benefits and Harms of Hormone Replacement Therapy Clinical Applications, *JAMA*, 288(7), 882-4.
56. Nielsen SW, 1983, Classification of tumors in dogs and cats, *J Am Anim Hosp Assoc*, 19, 13-60.
57. Okkens AC, Kooistra HS, Nickel RF, 1997, Comparison of longterm effects of ovariectomy versus ovariohysterectomy in bitches, *J Reprod Fertil*, 51(Suppl), 227-31.
58. Okkens AC, van de Gaag I, Biewenga WJ, Rothuizen J, Voorhout G, 1981a, Urological complications following ovariohysterectomy in dogs, *Tijdschr Diergeneeskd*, 106, 1189-98.
59. Okkens AC, Dieleman SJ, van de Gaag I, 1981b, Gynaecologische complicaties na ovariohysterectomy bij de hond ten gevolge van: 1. het incompleet verwijderen van de ovaria en 2. een ontsteking van de uterus-cervix stomp, *Tijdschr Diergeneeskd*, 106, 1142-58.
60. Olsen J, Komtebedde J, Lackner A, Madewell BR, 1994, Cytoreductive treatment of ovarian carcinoma in a dog, *J Vet Int Med*, 8, 133-5.
61. Pankaj G, Raghunath M, 2010, Evaluation of regional lymph node aspiration cytology in detecting metastasis of canine mammary tumours *Indian Journal of Veterinary Surgery*, 32(1), 59-60.
62. Patnaik AK, Greenlee PG, 1987, Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors, *Vet Pathol* 24, 509-14.
63. Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, 2003, Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors, *J Vet Intern Med* 17, 102-6.
64. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard C, 2005, In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, 130, 193-201.
65. Salmeri KR, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille V, 1991, Gonadectomy in immature dogs: Effects on skeletal, physical, and behavioral development. *JamVet Med Assoc* 198(7), 1193-203.
66. Schaefer-Okkens AC, 2010, Estrous cycle and Breeding Management of the Healthy Bitch, In: Ettinger SJ, Feldman, editors, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Missouri: Saunders, Elsevier, 1873-83.
67. Schaefer-Okkens AC, Kooistra HS, 2009, Female reproductive tract. In: Rijnberk A, van Sluijs FJ, ed. *Medical history and physical examination in companion animals*, Philadelphia: Saunders, 2009, 108-17.

68. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO, 1969, Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *J Natl Cancer Inst*, 43, 1249-61.
69. Schneider R, 1990, Epidemiological aspects of mammary and genital neoplasia. In: Morrow D, editor, *Current Therapy in Theriogenology*, Philadelphia: Saunders, 636.
70. Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH, 2000, Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma, *J Vet Intern Med*, 14, 266-70.
71. Stone AE, Cantrell CG, Sharp NJ, 1993, Ovary and uterus, In: Slatter D, editor, *Textbook of Small Animal Surgery*, Philadelphia: Saunders, 1293-308.
72. Stone AE, 2003, Ovary and uterus, In: Slatter D, editor, *Textbook of Small Animal Surgery* Philadelphia: Saunders, 1495-9.
73. Ström B, Linde-Forsberg C, 1993, Effects of ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole on the vaginal bacterial flora of bitches. *Am J Vet Res*, 54(6), 891-6.
74. van Goethem B, Schaeffers-Okkens A, Kirensteijn J, 2006, Making a Rational Choice Between Ovariectomy and Ovariohysterectomy in the Dog: A Discussion of the Benefits of Either Technique, *Veterinary Surgery*, 35, 136-43.
75. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M, 1996a, Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification, *J Vet Med Sci*, 58, 1079-83.
76. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M, 1996b, Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours, *J Small Anim Pract* 37, 462-4.
77. Watts J R, Wright P J, Whithear K C, 1996, Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle, *Journal of Small Animal Practice*, 37, 54-60.
78. Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB, Seager SWJ, 1978, Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod*, 18, 561-70.
79. Wilson RB, Cave JS, Copeland JS, Onks J, 1985, Ovarian teratoma in 2 dogs, *J Am Anim Hosp Assoc*, 21, 249-53.

**NEADEKVATAN TRANSFER PASIVNOG IMUNITETA
KOD NOVOROĐENE TELADI**

***FAILURE OF PASSIVE TRANSFER OF IMMUNITY IN
NEWBORN DAIRY REPLACEMENT CALVES***

Fratrić Natalija, Gvozdić Dragan

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Kratak sadržaj

Neadekvatan transfer pasivnog imuniteta se definiše kao nivo IgG u krvnom serumu manji od 10g/l, 24-48h posle rođenja. Snabdevanje novorođene teladi adekvatnom količinom imunoglobulina je neophodna komponenta za preživljavanje, zdravlje i buduću produktivnost. Telad sa neadekvatnim transferom pasivnog imuniteta imaju veće izglede da obole ili uginu u prva dva meseca života u odnosu na telad sa adekvatnim imunitetom. Brojni su faktori koji mogu dovesti do neadekvatnog transfera pasivnog imuniteta, ali kolostrum i menadžment ishrane kolostrumom su ključni. Telad bi trebalo da dobiju kolostrum 2 do 4 sata posle rođenja i da unesu 150 do 200g IgG kako bi bila osigurana dovoljna količina IgG. Kasnije davanje kolostruma, izostanak davanja ili davanje kolostruma lošeg kvaliteta je primarni uzrok neadekvatnog transfera pasivnog imuniteta kod teladi. Svaki kolostrum nije isti. Postoje velike razlike među kravama u kvalitetu kolostruma i trebalo bi testirati kolostrum da bi se teletu obezbedio kolostrum dobrog kvaliteta. Kada na raspolaganju ima kolostrum lošeg kvaliteta, proizvođač može kao zamenu koristiti zamrznuti kolostrum dobrog kvaliteta ili proizvode formulisane tako da se koriste kao dodatak ili zamena za kolostrum. Stalno praćenje i monitoring menadžmenta kolostruma pomaže proizvođačima da brzo identifikuju i koriguju problem koji je u vezi sa menadžmentom kolostruma.

Ključne reči: telad, kolostrum, neadekvatan transfer pasivnog imuniteta, faktori rizika, Imunoglobulini G.

Summary

Failure of passive transfer (FPT) in dairy calves is defined as a blood IgG level of less than 10 mg/mL at 24 to 48 hours after birth. Provision of an adequate immunoglobulin mass to dairy calves is an essential component for survival, health, and future productivity. Calves that experience FPT are more likely to become sick

or die in the first two months of life than calves with adequate immunity. Many factors can contribute to FPT, but colostrum and the management of colostrum feeding are often involved. All calves should receive colostrum within 2 to 4 hours of birth. Research suggests that calves should be fed at least 100 g of IgG, and feeding 150 to 200 g is recommended to ensure plenty of IgG is available to the calf. Feeding colostrum late or not at all and feeding poor quality colostrum are primary causes of FPT in calves. Unfortunately, not all colostrum is the same. There is a lot of variability between cows, and all colostrum should be tested to ensure its quality. When available colostrum is low in quality, producers have several options using stored colostrum and products formulated to supplement or replace colostrum. Ongoing monitoring helps producers to more quickly identify and correct problems within the colostrum management program.

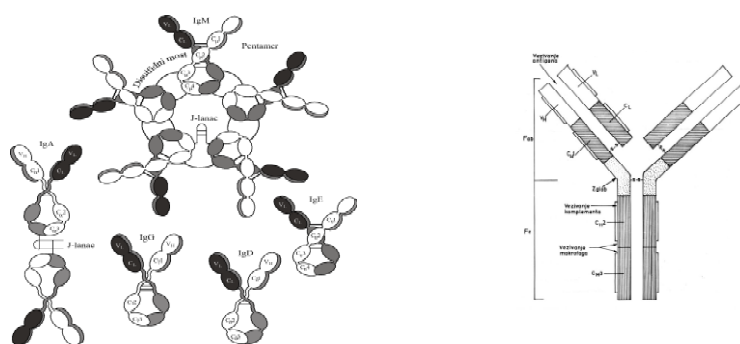
Key words: *dairy calves, colostrums, failure of passive transfer of immunity, risk factor, immunoglobulin G.*

Uvod

Sobzirom na strukturu placente kod goveda telad se rađaju bez imunoglobulina (fiziološka agamaglobulinemija) i zavise od pasivnog transfera maternalnih imunoglobulina (Ig) preko kolostruma. Adekvatan pasivni transfer zavisi od kvaliteta i unete količine kolostruma i resorpcije Ig (Weaver i dr. 2000). Uzimanje adekvatne količine kolostruma dobrog kvaliteta u toku prvih 24 posle rođenja značajno je za zdravlje teladi i buduće proizvodne rezultate. Transfer imuniteta se smatra adekvatnim ukoliko je koncentracija IgG u krvnom serumu 10g/l (Lorenz i sar., 2011). Koncentracija ukupnih serumskih proteina od 52g/l kod zdravih dobro hidriranih teladi smatra se takođe merom adekvatnog pasivnog transfera imuniteta. Neadekvatan transfer pasivnog imuniteta (failure of passive transfer - FPT) je prisutan kada je koncentracija IgG1 u krvnom serumu IgG < 10 g/L, 24-48^h posle rođenja. Iako se više od 100 godina zna za značaj kolostruma, FPT je i dalje značajan problem kod teladi. Istraživanja su pokazala da FPT može iznositi oko 20% i više. Godden, (2008) je pokazao da 31% uginuća u prve 3 nedelje kod teladi pre odbijanja u vezi je sa FPT. Neadekvatan pasivni transfer imuniteta kod teladi je važan sa mnogo aspekata: povećava morbiditet, mortalitet, dovodi do smanjenog prirasta i dugoročno gledano utiče na smanjenje produktivnosti (smanjena je proizvodnja mleka u prvoj i drugoj laktaciji), rano izlučenje čak i kod prve laktacije. Mnogi faktori mogu doprineti FPT, ali menadžment kolostruma i ishrane kolostrumom su ključni faktori.

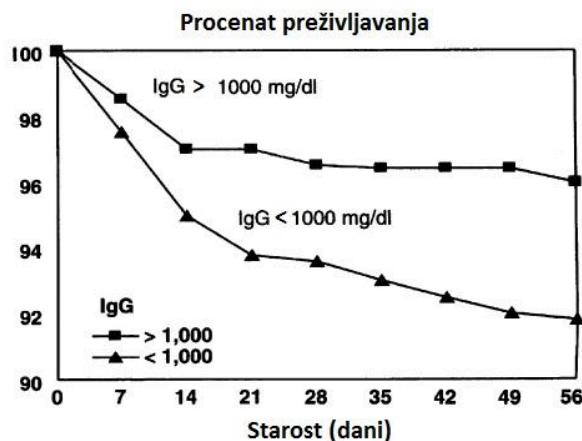
Međutim, ohrabrujuća je činjenica da je poslednjih godina primećen napredak u ovoj važnoj oblasti menadžmenta teladi. Ovaj napredak je posledica kampanje obrazovanja i ubeđivanja proizvođača u značaj menadžmenta kolostruma.

Kolostrum sadrži vrlo veliku koncentraciju imunoglobulina (40-200 g/l). IgG1 čine preko 75% imunoglobulina u kolostralnom serumu, ostali pripadaju IgM, IgA i IgG2 klasi i podklasi (Korhonen i dr. 2000). Pored imunoglobulina kolostrum obezbeđuje brojne druge značajne sastojke kao što su imunske ćelije, citokini, drugi nespecifični imunski faktori, faktori rasta. Kolostrum sadrži više proteina, imunoglobulina, ne proteinskog azota, masti, suve materije, vitamina i minerala nego mleko. Telad bi trebalo da dobiju kolostrum 2 do 4 sata posle rođenja i da unesu 150 do 200g IgG kako bi bila osigurana dovoljna količina IgG. Znači, novorođenim teladima treba dati prvi kolostrum koji sadrži adekvatnu količinu Ig u količini od 3l do 4l. Kasnije davanje kolostruma, izostanak davanja ili davanje kolostruma lošeg kvaliteta je primarni uzrok FPT kod teladi. Da bi se prevenirao FPT koji nastaje kao posledica sisanja majki, novorođenu telad bi trebalo odvojiti od majke u roku od 30 minuta posle rođenja.



Slika 1. Šematski prikaz klasa imunoglobulina

Ispitivanje i praćenje adekvatnosti programa ishrane kolostrumom je ispravan način da se preveniraju zdravstveni problemi kod teladi i identifikuje potencijalna potreba za davanjem suplemenata kolostruma (upotrebljavaju se da bi se povećala količina unetog IgG kada je na raspolaganju kolostrum lošeg ili srednjeg kvaliteta) ili zamena za kolostrum (McGuirk i Collins, 2004). Davanje suplemenata kolostruma ne može zameniti kolostrum visokog kvaliteta. Upotreba zamena za kolostrum je korisna ako teletu nije na raspolaganju dovoljna količina čistog i kolostruma visokog kvaliteta. Kada na raspolaganju ima kolostrum lošeg kvaliteta, proizvođač može kao zamenu koristiti zamrznuti kolostrum dobrog kvaliteta.



Slika 2. Procenat preživljavanja teladi u zavisnosti od koncentracije IgG u krvnom serumu

Svaki kolostrum nije isti. Postoje velike razlike u kvalitetu kolostruma među kravama i trebalo bi testirati kolostrum da bi se teletu obezbedio kolostrum dobrog kvaliteta. Koncentracija IgG u kolostrumu može dramatično da varira između krava. U skorašnjoj studiji Swan i sar., (2007) su pokazali da je prosečna koncentracija IgG u kolostrumu 76 g/L, sa variranjem od 9 do 186 g/L kod Holštajn rase. Iako faktori kao što su menadžment na nivou stada, ishrana, sredina mogu uticati na varijabilnost u koncentraciji Ig u kolostrumu mlečnih krava, broj laktacije, rasa, vreme uzorkovanja kolostruma, pulovanje, predhodne epizode sisanja pre skupljanja kolostruma, dužina perioda zasušenja, prepartalna vakcinacija takođe su veoma značajni. Krave u 4 laktaciji ili većoj imaju značajno viši nivo IgG po litri kolostruma nego krave u prvoj i drugoj laktaciji, mada i o tome danas postoje kontroverzna mišljenja. Koncentracija kolostralnih IgG opada za 3,7% tokom svakog sledećeg sata od teljenja, što znači da je vreme prve muže krucijalni faktor za kvalitet kolostruma na koji proizvođač može uticati. Krave oteljene u zimskom periodu proizvode kolostrum sa značajno manjim nivoom IgG u poređenju sa kravama oteljenim u bilo kom drugom periodu godine. Broj somatskih ćelija meren posle teljenja značajno je viši kod krava sa kolostrumom lošijeg kvaliteta u poređenju sa onim kravama koje proizvode kolostrum visokog kvaliteta (Gulliksen i sar., 2007). Pulovanje kolostruma dovodi do razblaženja i može biti put za prenošenje patogena (*Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*).

Navedeni podaci ukazuju na potrebu da se unapredi kontrola kvaliteta kolostruma i posledično podesi režim ishrane kolostrumom kako bi se obezbedio adekvatan pasivni imunitet novorođene teladi. Danas se smatra da su krave u prvoj i kasnijim laktacijama odgovarajući davaoci kolostruma, ako su zdrave,

vakcinisane, imaju odgovarajuću dužinu perioda zasušenja i optimalan menadžment tranzicionog perioda.

Menadžment kolostruma je jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na zdravlje i preživljavanje teladi. Uspešan program menadžmenta kolostruma zahteva od proizvođača da poboljšaju njihovu praksu menadžmenta kolostruma, što dovodi do poboljšanja zdravlja i performanci životinje kratkoročno i dugoročno. Stalno praćenje pomaže proizvođačima da mnogo brže identifikuju i koriguju problem koji je u vezi sa programom menadžmenta kolostruma. Naše kolege na terenu bi trebalo da pomognu proizvođačima da razviju program (procedure) rutinskog praćenja menadžmenta kolostruma.

Kvalitet kolostruma može se proceniti na farmi kolostrometrom. Kolostrometar, instrument kojim se može proceniti koncentracija IgG merenjem specifične težine kolostruma, to je jednostavan i jeftin metod koji se može koristiti za razlikovanje kolostruma visokog i niskog kvaliteta (specifična težina >1.050 približna koncentracija IgG >50 g/L). Faktori kao što su sadržaj masti i drugi sastojci kolostruma, kao i temperatura kolostruma mogu uticati na očitane vrednosti. S obzirom na senzitivnost i specifičnost metode (0.32 i 0.97) za utvrđivanje kolostruma niskog kvaliteta, može se desiti da se čak dva od tri kolostruma lošeg kvaliteta procene kao prihvatljivi. Da bi se izbegla greška trebalo bi kod graničnih vrednosti od 45, 60 ili 110g/l davati pri prvom hranjenju 3.78, 2.84, ili 1.89 L kolostruma, pojedinačno. Može se koristiti i imunoesej kit (cow-side immunoassay kit - Colostrum Bovine IgG Quick Test Kit, Midland Bio-Products, Boone, Iowa).

Mnogo realniju sliku o kvalitetu kolostruma na nivou stada daje upotreba refraktometra (Weaver i sar., 2000). Merenje ukupnih serumskih proteina refraktometrom pruža jednostavan, brz i jeftin način kojim proizvođači na licu mesta, na farmi mogu pratiti program ishrane kolostrumom. Refraktometar se upotrebljava za ispitivanje ukupnih serumskih proteina kao mere pasivnog transfera maternalnog imuniteta. Koncentracija ukupnih serumskih proteina od 52 g/L ekvivalentna je 10 g/L serumskog IgG i predstavlja adekvatan transfer pasivnog imuniteta za zdravu telad do 8 dana (sensitivnost >0.80; specifičnost >0.80). Pogodan je za procenu FPT na nivou stada, može se odrediti procenat teladi sa FPT, što daje podatak o uspešnosti programa menadžmenta kolostruma. Preporuka je da se uzima minimum 12 zdravih teladi starosti između 24 sata i 7 dana. Pošto rezultati centrifugovanih i necentrifugovanih seruma visoko koreliraju ($R^2 = 0.95$), test se može izvoditi i na farmi bez centrifuge. McGuirk and Collins (2004) smatraju da je cilj da više od 80% testiranih ima ukupne serumske proteine od 55g/l. Ako veliki procenat ispitivane teladi ima FPT, veterinar i proizvođač moraju identifikovati i korigovati uzrok nastanka FPT.

Potreba za kontrolom i praćenjem da li je transfer pasivnog imuniteta novorođene teladi uspešan doveo je do razvoja više tehnika-eseja za kvantitativno ili semikvantitativno određivanje koncentracije serumskih

imunoglobulina kod teladi. Laboratorijski testovi koji se mogu koristiti za direktno merenje ili ispitivanje koncentracije IgG u krvnom serumu kod teladi uključuju radialnu imunodifuziju (radial immunodiffusion- RID) turbidimetrijski imunoesej (turbidimetric immunoassay-TIA), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), natrijum sulfat turbidimetrijski test (sodium sulfite turbidity test), cink sulfat turbidimetrijski test (zinc sulfate turbidity test), aktivnost serumske gama glutamiltransferaze (serum gamma glutamyltransferase-GGT). Iako RID, TIA, ili ELISA bi mogli biti prihvatljivi testovi, troškovi nisu mali a i treba ubediti proizvođača u potrebu da se redovno šalju uzorci seruma na analizu.

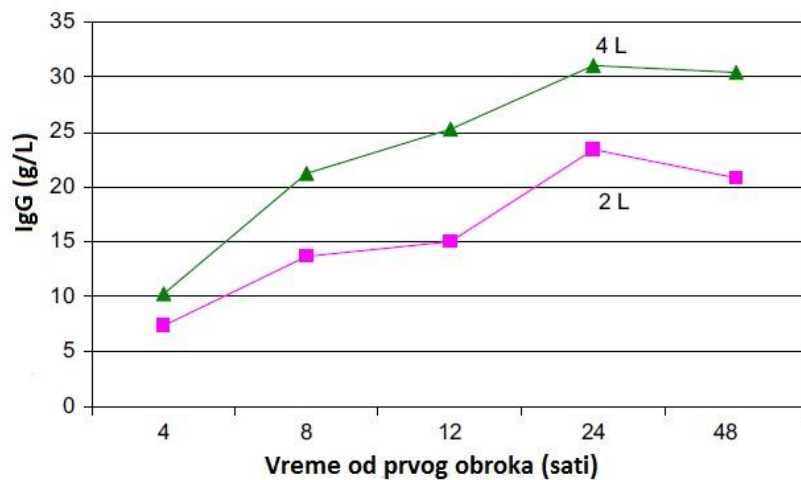
Ključni faktori za uspešan transfer pasivnog imuniteta kod teladi:

Dobro su poznata četiri ključna faktora koji doprinose uspešnom transferu pasivnog imuniteta: 1) ishrana kolostrumom koji sadrži visok nivo IgG (>50g/L); 2) adekvatna količina posisanog kolostruma; 3) ishrana kolostrumom odmah nakon rođenja; 4) sprečavanje bakterijske kontaminacije kolostruma. Pasivni transfer imuniteta je uspostavljen ako je minimalna koncentracija IgG > od 10g/L u serumu teladi starosti od 1 do 7 dana.

Snabdevenost novorođene teladi adekvatnom masom Ig zahteva i hranjenje velikom količinom – volumenom kolostruma. Ova praksa nije usvojena od strane mnogih proizvođača. Pozitivan odnos koji postoji između mase unetih Ig i poboljšane efikasnosti absorpcije Ig predstavlja argument za hranjenje kolostrumom u količini koja obezbeđuje ≥ 150 g Ig što pre posle rođenja jer se efikasnost resorpcije imunoglobulina smanjuje kako vreme od rođenja protiče.

Volumen kolostruma pri prvom hranjenju

Za uspešan transfer pasivnog imuniteta kod teladi Holštajn rase preporuka je da proizvođači daju prvi kolostrum koji ima najmanje 100g IgG/L kolostruma. Kolika je onda količina kolostruma koja se mora dati teletu? Količina zavisi od koncentracije IgG u kolostrumu. Ako kolostrum sadrži 50 g/L IgG, proizvođač može dati 1.89 L da bi se postigao cilj, tj. ingestija IgG veća od 100g. Ako kolostrum ima 25 g/L IgG, onda bi trebalo da se da 3.78 L da bi se postigao isti cilj. Zbog toga što proizvođači ne znaju kolika je koncentracija IgG u kolostrumu, preporučuje se da telad hrane prvim kolostrumom u količini koja iznosi 10-12% od telesne mase teleta. U jednom skorijem radu je pokazano da je koncentracija IgG u krvnom serumu 24-og sata bila značajno veća kod teladi koja su dobijala 4L kolostruma visokog kvaliteta 0 sata i još 2L, 12 sata (31.1 g/L IgG) u poređenju sa teladima koja su dobijala 2L kolostruma visokog kvaliteta 0 sata i još 2L, 12 sata (23.5 g/L IgG) (Godden, 2008).



Slika 3. Koncentracija IgG u serumu teladi koja su dobijala na rođenju 4l ili 2l kolostruma (telad su dobijala dodatno 2l kolostruma 12 sata starosti)(Morin i sar., 1997)

Efikasnost resorpcije Ig

Enterociti novorođene teladi imaju sposobnost da neselektivno absorbiraju pinocitozom intaktne makromolekule uključujući i Ig. Sposobnost resorpcije kolostralnih Ig opada progresivno posle 4 do 6 časova i potpuno prestaje 38 sati od rođenja. Ishrana kolostrumom posle tog vremena je takođe korisna zbog beneficija u lokalnom imunitetu na nivou creva. Mnogi autori su ispitivali uslove pod kojima se može povećati resorpcija kolostralnih Ig (Davenport i sar., 2000; Stojić i sar., 1995; Fratrić i sar., 2005). Stojić i sar., (1995) i Fratrić i sar., (2005) jasno su pokazali da mineralni adsorber na bazi klinoptilolita dodat u kolostrum dovodi do značajnog povećanja koncentracije IgG u krvi kod novorođene teladi. Što tele pre dobije kolostrum veći je nivo resorpcije. Preporuka je da se teletu normalne veličine (Holštajn-Frizijske rase) daje 3L kolostruma dobrog kvaliteta 2h od rođenja ezofagealnom sondom ili najmanje 3L do 4h i ukupno 4L unutar 12h od rođenja iz boce sa cuclom. Količina kolostruma koju će tele voljno popiti ne menja se u prvih 4 sata i nema svrhe odlagati prvo hranjenje. Ishrana preko sonde obezbeđuje uspešan pasivni transfer ako se da veća količina kolostruma. Ako se daje manji volimen i ako je količina Ig marginalna trebalo bi tele hraniti iz boce jer je absorpcija bolja nego ako je kolostrum dat preko sonde (Godden i sar., 2009). U Americi je davanje preko sonde prisutno kod 14% teladi dok je u Evropi upotreba sonde diskutabilna i komplikuje je zakonska regulativa o dobrobiti životinja koja u nekim zemljama zabranjuje forsiranu ishranu životinja (osim u terapeutske svrhe).

Faktori: su pod kontrolom menadžmenta

1. Vreme prvog hranjenja- (transfer Ig kroz zid creva optimalan je u prvih 4 časa posle rođenja, posle 6 časova progresivno opada. Proizvođači bi trebalo da hrane telad 1 do 2 sata posle rođenja a najviše do 6 sati. Kasnije davanje kolostruma odlaže zatvaranje “gut closure” zida creva na 36 sati.
2. Metod hranjenja-značajan je jer utiče na vreme prvog hranjenja, uneti volumen, efikasnost absorpcije (FPT se često javlja kod teladi koja se ostave uz majku da sisaju). Preporučuje se da se tele odvoji od majke u roku od 1 do 2 sata i da se nahrani sa poznatom količinom kolostruma iz boce sa cuclom ili ezofagealnom sondom. Veterinari bi trebalo da pokažu zainteresovanim proizvođačima kako pravilno da upotrebe ezofagealnu sondu i kako da je čiste.
3. Metabolički poremećaji- respiratorna acidoza (usled produženog partusa), smanjena je resorpcija kolostralnih Ig u prvih 12h i povećana je incidenca FPT usled nemogućnosti ustajanja teleta da jede pre nego redukcije absorptivnog kapaciteta.
4. Bakterijska kontaminacija kolostruma- bakterije iz kolostruma mogu vezati slobodne Ig u lumenu creva ili direktno blokirati resorpciju i transport molekula Ig kroz epitel creva, što znači da interferiraju sa pasivnom resorpcijom kolostralnih Ig. Istraživanja su pokazala da je efikasnost resorpcije Ig iz pasterizovanog kolostruma veća (35%) u odnosu na sirov kolostrum (27%).

Strategije u cilju preveniranja kontaminacije kolostruma:

Iako je kolostrum značajan izvor hranljivih materija i imunskih faktora takođe može predstavljati rizik za tele ukoliko se u kolostrumu nađu infektivni agensi kao što su : *Mycoplasma* spp, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, fekalni koliformi i *Salmonella* spp. Ovo je značajno zbog toga što patogene bakterije ako su prisutne u kolostrumu mogu izazvati bolest kao što su proliv i septikemija. Takođe, njihovo je prisustvo značajno jer mogu interferirati sa resorpcijom kolostralnih Ig. Svež kolostrum kojim se hrane telad ne bi smeo da sadrži više od 100,000 cfu/mL ukupnih bakterija i ne više od 10,000 cfu/mL ukupnih koliformnih bakterija. Nažalost kolostrum kojim se hrane telad često sadrži više bakterija od ovih graničnih vrednosti.

Tehnike koje utiču na smanjenje bakterijske kontaminacije kolostruma:

Preveniranje kontaminacije tokom skupljanja, čuvanja, hranjenja

Smanjenje rizika od širenja patogena na telad preko kolostruma uključuje izbegavanje hranjenja kolostrumom od inficiranih krava, izbegavanje pulovanja kolostruma. Da bi se smanjila kontaminacija kolostruma važna je pravilna priprema vimena pre muže, muža u čiste kante i da čuvanje kolostruma kao i hranjenje bude iz čiste opreme i posuda.

Preveniranje i minimiziranje rasta bakterija u kolostrumu koji se čuva

Bakterije se mogu brzo razmnožavati ako se kolostrum i mleko čuvaju na visokoj spoljnoj temperaturi. Ako se kolostrum neće odmah koristiti za hranjenje trebalo bi ga zamrznuti ili ostaviti u frižider u roku od 1 sat posle skupljanja. Zamrznut se može čuvati i godinu dana. Kada se otapa zamrznuti kolostrum trebalo bi izbegavati visoke temperature (>60°C or 140°F) da ne bi došlo do denaturacije Ig. IgG u sirovom kolostrumu je stabilan nedelju dana u frižideru. Međutim broj bakterija u kolostrumu koji se čuva u frižideru posle 2 dana može biti povećan iznad dozvoljene granice (>100,000 cfu/mL).

Pasterizacija kolostruma

Ranije studije su koristile za pasterizaciju kolostruma konvencionalne metode i visoke temperature (63°C 30 minuta ili 72°C 15 sekundi) i pokazale su da takvim postupkom dolazi do denaturacije 1/3 kolostralnih IgG. Sadašnja istraživanja su pokazala da je niža temperatura i duže vreme (60°C za 60 minuta) pasterizacije dovoljno da održi aktivnost IgG i tečnu strukturu kolostruma dok se eventualno prisutni patogeni u kolostrumu eliminišu ili im se broj redukuje (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Mycoplasma bovis* i *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*).

Upotreba suplemenata ili zamene za kolostrum

Postoje situacije, kada nema dovoljno čistog, visokog kvaliteta, svežeg ili zamrznutog kolostruma za ishranu sve novorođene teladi. Uz to se kolostrum krava pozitivnih na *M avium* subsp *paratuberculosis*, leukozu, ili *M bovis* mastitis odbacuje. U takvim okolnostima upotreba suplemenata kolostruma (colostrum supplements -CS) ili zamena za kolostrum (colostrum replacement -CR) pruža mogućnost da se poboljša nivo pasivnog imuniteta kod teladi i ujedno smanji rizik od prenosa patogena kolostrumom (Poulsen i sar., 2010; Pithua i sar., 2013). I jedan i drugi proizvod sadrže bovine Ig koji su poreklom ili iz kolostruma ili iz plazme. Proizvodi se rastvaraju u vodi prema deklaraciji i daju odvojeno posle davanja pravog kolostruma koji je bio na raspolaganju. Postoji značajna razlika u ceni između ova dva proizvoda, suplementi kolostruma su jeftiniji od zamena za kolostrum. Suplementi kolostruma sadrže manje od 50g/l IgG po dozi i služe samo da dopune a ne i da zamene kolostrum. Ako se daju samo oni (suplementi kolostruma) koncentracija Ig u krvnom serumu biće niža i postojaće veliki rizik od nastanka FPT kod teladi u odnosu na onu telad koja su dobila sveži kolostrum. Ako tele dobija 3L do 4L kolostruma visokog kvaliteta nema nikakve dodatne beneficije u davanju još i suplementa kolostruma. Zamene za kolostrum sadrže minimum 100g IgG po dozi, obezbeđuju proteine, energiju, vitamine, minerale i napravljeni su tako da kompletno zamene (ili koriste u ishrani ako nema) maternalni kolostrum. Međutim, pokazalo se da je efikasnost zamena za kolostrum različita, jer se upotrebom mnogih proizvoda nije uspela obezbediti neophodna koncentracija IgG od 10g/l u serumu teladi. Ishrana većim dozama

zamena za kolostrum može povećati nivo uspešnosti pasivnog transfera, ali se postavlja pitanje isplativosti. Zbog toga što postoje razlike u performansama između različitih proizvoda koji postoje na tržištu, veterinari bi trebalo da budu dobro obavešteni i da vode računa kada preporučuju određeni proizvod kao zamenu za kolostrum.

Kada je rizik da nastane FPT veći:

1. Na nekim farmama FPT je u vezi sa nedostatkom dovoljne količine kvalitetnog kolostruma. Farmeri koji ne koriste kolostrum od primipara za ishranu teladi ili imaju krave sa zdravstvenim problemima na teljenju (mastitis), ili kolostrum curi iz sisa pre teljenja trebalo bi da imaju nekoliko donora kolostruma dobrog kvaliteta. Nedostatak kolostruma može takođe biti prisutan na farmama koje ne koriste kolostrum od krava pozitivnih na *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella dublin*, *Mycoplasma bovis*, bovine leukosis virus, bovine viral diarrhoea virus, ili *Neospora caninum*. Poznato je da se preko kolostruma može preneti *M paratuberculosis*. Malo je proizvođača koji čuvaju dobar kolostrum zamrznut kao rezervu kada istog nema na raspolaganju.
2. ukoliko se koristi pulovan kolostrum (razređuje se kolostrum, kontaminacija-smanjena resorpcija Ig)
3. ukoliko se ostavi da tele sisa majku (neadekvatna količina kolostruma i vreme uzimanja, kontaminacija)
4. ako se kolostrum daje iz kante 4 i više časova posle rođenja (smanjuje se resorpcija sa vremenom)
5. ukoliko se novorođenom teletu koje je bilo izloženo distokiji ne obezbedi viša temperatura ambijenta tokom hladnog vremena
6. ukoliko nije bilo veterinarske pomoći i asistencije pri rođenju a njegova pozicija je to zahtevala
7. ukoliko se ne prati koncentracija proteina u serumu teladi kao parametar pasivnog transfera imuniteta

Praksa menadžmenta (prevniranje nastanka FPT)

Pokazalo se važnim u preveniranju nastanka FPT: odvajanje teleta od majke pre sisanja, izbacivanje pulovanja kolostruma (Beam i sar., 2009), veći volumen kolostruma manji rizik od FPT (Trotz-Williams i sar., 2008), davanje kolostruma do 4 h posle rođenja (Godden, 2008), rutinska kontrola ukupnih serumskih proteina, pasterizacija kolostruma (smanjenje broja bakterija koje mogu da interferiraju sa resorpcijom IgG) (Johnson I sar., 2007), veterinarska asistencija kod teškog teljenja (Szenci, 1983).

Buduća istraživanja:

Ispitivanje prevalence neadekvatnog transfera pasivnog imuniteta kod teladi mlečnih krava u Republici Srbiji. Bilo bi neophodno da budu zastupljena sva područja–regioni sa teritorije Srbije i sa različitim menadžmentom-operativnim sistemima. Broj krava u stadu trebalo bi da bude veći od 20 i to bi dalo reprezentativne nacionalne podatke koji bi se mogli koristiti za ispitivanje veze neadekvatnog transfera pasivnog imuniteta i prakse vezane za menadžment kolostruma i teladi.

Napomena:

Ovaj rad je delimično finansiran sredstvima Projekta br III 46002 i Projekta TR 31050 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura:

1. Beam AL, Lombard JE, Koprak CA, Garber LP, Winter AL, Hicks JA, Schlater JL, 2009, Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations, *J Dairy Sci*, 92, 3973-80.
2. Devenport DF, Quigley JD, Martin JE, Holt JA, Arthington JD, 2000, Addition of casein or whey protein to colostrum or a colostrum supplement product on absorption of IgG in neonatal calves, *J Dairy Sci*, 83, 2813-9.
3. Fratrić N, Stojić V, Janković D, Šamanc H, Gvozdić D, 2005, The effect of a clinoptilolite based mineral adsorber on concentrations of immunoglobulins G in the serum newborn calves fed different amounts of colostrums, *Acta Veterinaria, Beograd*, 55, 11-21.
4. Godden S, 2008, Colostrum Management for Dairy Calves, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 24, 19–39.
5. Godden SM, Haines DM, Hagman D, 2009, Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. I: dose effect of feeding a commercial colostrum replacer, *J Dairy Sci*, 9, 1750-7.
6. Gulliksen, S. M. Lie K. I., Sølverød L., and Østera O. 2007, Risk Factors Associated with Colostrum Quality in Norwegian Dairy Cows, *J. Dairy Sci.* 91:704–712.
7. Johnson JL, Godden SM, Molitor T, Ames T, Hagman D, 2007, Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves, *J Dairy Sci*, 90, 5189-98.
8. Korhonen H, Marnila P, Gill HS, 2000, Milk immunoglobulins and complement factors, *Br J Nutr*, 84, 75 – 80.
9. Lorenz I, Mee JF, Earley B, More SJ, 2011, Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention, *Ir Vet J*, 16, 64(1):10.

10. McGuirk SM, Collins M, 2004, Managing the production, storage, and delivery of colostrums, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20, Issue 3, 593-603.
11. Morin DE, McCoy GC, Hurley WL, 1997, Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves, *J Dairy Sci*, 80,747-53.
12. Pithua P, Aly SS, Haines DM, Champagne JD, Middleton JR, Pooock SE, 2013, Efficacy of feeding a lacteal-derived colostrum replacer or pooled maternal colostrum with a low IgG concentration for prevention of failure of passive transfer in dairy calves, *J Am Vet Med Assoc*, 15, 277-82.
13. Poulsen KP, Foley AL, Collins MT, McGuirk SM, 2010, Comparison of passive transfer of immunity in neonatal dairy calves fed colostrum or bovine serum-based colostrum replacement and colostrum supplement products, *J Am Vet Med Assoc*, 15, 949-54.
14. Stojić V, Šamanc H, Fratrić Natalija, 1995, The effect of a clinoptilolite based mineral adsorber on colostrum immunoglobulin G adsorption in newborn calves, *Acta Veterinaria, Beograd*, 45, 67-74.
15. Swan H, Godden S, Bey R, *et al* 2007, Passive transfer of immunoglobulin g and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer, *J Dairy Sci*, 90, 3857-66.
16. Szenci O, 1983, Effects of type and intensity of assistance on acid-base balance of newborn calves, *Acta Vet Hung*, 31, 73-9.
17. Trotz-Williams LA, Leslie KE, Peregrine AS, 2008, Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices, *J Dairy Sci*, 91, 3840-9.
18. Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, et al, 2000, Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves, *J Vet Intern Med*, 14,569-77.

MATERINSKO PREPOZNAVANJE GRAVIDITETA

MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY

Gvozdić Dragan, Fratrić Natalija

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Republika Srbija

Kratak sadržaj

Uspeh i očuvanje gestacije zasniva se na materinskom prepoznavanju graviditeta i implantacije. Kod većine sisara je za uspeh graviditeta neophodno postojanje žutog tela (CL) i sekrecija progesterona. Procena stručnjaka iz oblasti reprodukcije krava govori da je stepen oplodnje oko 90%, dok je prosečan broj oteljenih krava oko 55%. Ovaj okvirni podatak ukazuje da je procenat uginuća embriona/fetusa prosečno 35%, pri čemu je 70-80% ukupnog embrionalnog uginuća između 8-16 dana od osemenjavanja. Visok stepen ranog embrionalnog uginuća može se tumačiti neadekvatnom komunikacijom između ploda (plod sa ovojnicama - **konceptus**) i organizma majke.

Izostanak luteolize kod oplodjenih ženki je od ključne važnosti za opstanak embriona. Luteoliza nastaje pod dejstvom lokalno aktivnog luteolitika prostaglandina F2 alfa (PGF_{2α}). Kod gravidnih životinja luteoliza izostaje jer se od strane konceptusa sintetiše interferon tau (IFNτ). Interferon tau deluje na endometrijum i površinski sloj epitela materičnih žlezda, dovodeći do supresije transkripcije receptora za oksitocin i estradiol. Inhibirajući porast ekspresije receptora za oksitocin i estradiol, koji su neophodni za sintezu i lučenje prostaglandina, IFNτ onemogućava porast sekrecije PGF_{2α}. Na ovaj način se indirektno inhibira mehanizam luteolize i omogućava produženje životnog veka CL, sekrecija progesterona ostaje i dalje povišena, dolazi do implantacije i uspešnog embrionalnog razvoja.

Ključne reči: materinsko prepoznavanje graviditeta, IFNτ, PGF_{2α}.

Summary

Successful gestation in domestic animals is established after maternal recognition of pregnancy and implantation. Functional corpus luteum (CL) and progesterone secretion are prerequisites for embryonic/fetal survival. It has been estimated that about 90% of dairy cows conceive after insemination, while average number of calving is about 55%. This estimation and other data indicate that embryonic/fetal mortality rate is about 35%, with about 70-80% of embryonic

mortality occurring between 8-16 days after insemination. Increased rate of early embryonic mortality could be explained by an inadequate maternal-conceptus communication.

Embryonic survival is based on the prevention of luteolysis (CL regression). Luteolysis is triggered by the action of locally active tissue hormone prostaglandin F2 alpha (PGF_{2α}). If the conception has occurred growing conceptus secretes interferon tau (IFN τ). It acts locally on the endometrium and inhibits the expression of receptors for oxytocin and estradiol, which are necessary for increased PGF_{2α} production. That way luteolysis is prevented, CL lifespan is extended, progesterone secretion is uninterrupted and embryonic survival is secured.

Key words: *maternal recognition of pregnancy, IFN τ , PGF_{2α}*

Rano uginuće embriona

Uspeh i očuvanje gestacije zasniva se na materinskom prepoznavanju graviditeta i implantaciji. Frazu “materinsko prepoznavanje graviditeta” uveo je u literaturu Rodžer Šort (1969), definišući je kao fiziološki proces putem kojeg conceptus signalizira organizmu majke svoje postojanje i dovodi do produženja životnog veka žutog tela (*corpus luteum*, CL). Kod većine sisara je za uspeh graviditeta neophodno postojanje CL i sekrecija progesterona. Progesteron deluje na uterus tako što stimuliše njegove funkcije neophodne za održanje i razvoj embriona, implantaciju, placentaciju, očuvanje i rast fetusa sve do partusa. Produženje životnog veka CL je karakteristika graviditeta kod onih vrsta gde period gestacije traje duže u odnosu na normalan estrusni (ili menstrualni) ciklus.

Procena stručnjaka iz oblasti reprodukcije krava govori da je stepen oplodnje oko 90%, dok je prosečan broj oteljenih krava oko 55%. Ovaj okvirni podatak ukazuje da je procenat uginuća embriona/fetusa prosečno 35%, pri čemu je 70-80% ukupnog embrionalnog uginuća između 8-16 dana od osemenjavanja (Diskin i sar., 2006). Iako raniji podaci govore da se kod goveda oko 40% ukupnog gubitka embriona dešava između 8-17 dana graviditeta (Humbolt, 2001; Thatcher i sar., 2001), jasno je da rano uginuće embriona predstavlja jedan od glavnih faktora neuspešne reprodukcije. Ovako visok procenat ranog embrionalnog uginuća ima značajne ekonomske posledice dovodeći do produženja servis perioda. Visok stepen ranog embrionalnog uginuća može se tumačiti neadekvatnom komunikacijom između ploda (plod sa ovojnicama - **conceptus**) i organizma majke. Proces pravovremene razmene adekvatnih signala između ploda i organizma majke u periodu dok još nije nastupila implantacija je veoma složen i danas se nalazi se u centru pažnje velikog broja istraživača, kako u oblasti veterinarske tako i u humanoj medicini.

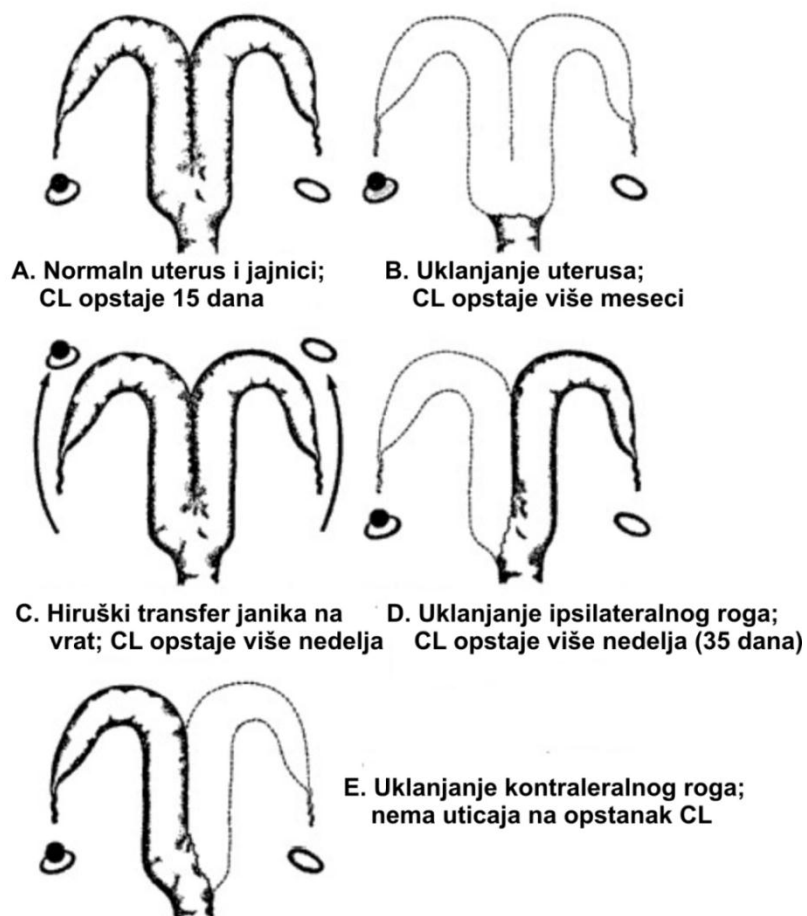
Žuto telo i materinsko prepoznavanje graviditeta

Uspostavljanje i održavanje graviditeta kod većine vrsta domaćih životinja nije moguće bez očuvanja aktivnog žutog tela. Žuto telo nastaje kao privremena endokrina struktura na mestu ovuliranog folikula. Žuto telo u toku fiziološkog estrusnog ciklusa kod najvećeg broja životinja ima ograničen životni vek i nakon određenog vremena dolazi do njegove regresije i razgradnje (luteoliza). Od dužine opstanka periodičnog žutog tela (*corpus luteum periodicum*) najvećim delom zavisi i trajanje kompletnog estrusnog ciklusa. Međutim, ukoliko je u periodu prethodnog estrusa došlo do uspešne oplodnje CL će imati produžen životni vek. Aktivno CL luči hormon progesteron i njegov nivo u krvi je povišen, što omogućava inhibiciju hipotalamusno-hipofizne osovine (H-H osovine). Usled inhibicije H-H osovine dolazi do izostanka sekrecije gonadostimulina, zaustavlja se razvoj folikula i njihova ovulacija, i izostaje folikularna faza sledećeg estrusnog ciklusa. Izostanak znakova estrusa je držaocima životinja obično prvi znak da je došlo do uspešnog začeća i da je njihova životinja gravidna. Još davne 1969. Šort je ovaj fenomen da prisustvo živog embriona u organizmu ženke sprečava lizu periodičnog CL i time ga pretvara u graviditetno žuto telo (*corpus luteum graviditas*), nazvao „materinsko prepoznavanje graviditeta“ (*maternal recognition of pregnancy*).

Uterus, CL i mehanizam luteolize

Pojam luteoliza označava razgradnju i dekompoziciju CL. Luteoliza nastaje tokom 1-3 dana na kraju lutealne faze estrusnog ciklusa. Luteoliza je proces tokom kojeg CL prolazi kroz ireverzibilne promene koje se karakterišu izraženim padom koncentracije progesterona u krvi. Hormoni koji regulišu luteolizu su oksitocin i progesteron iz CL, kao i prostaglandin F₂-alfa (PGF_{2α}) koga proizvode endometrijalne ćelije. Da bi nastupila uspešna luteoliza kod većine domaćih životinja potrebna je komunikacija između endometrijuma i CL. Endometrijum je odgovoran za sintezu i sekreciju PGF_{2α}, koji obezbeđuje luteolizu. Ukoliko luteoliza izostane doći će do produženja života CL, a time i lutealne faze ciklusa jer progesteron inhibira sekreciju gonadotropina. Kod svih sisara izuzev primata kompletno uklanjanje uterusa (*uterectomia; histerectomia*) nakon ovulacije dovodi do opstajanja CL i nakon isteka vremena njegove aktivnosti tokom ciklusa gde je izostala oplodnja, pa se tako čini da je životinja gravidna. Tako na primer, CL kod ovaca sa intaktnim uterusom za vreme ciklusa bez oplodnje opstaje oko 17 dana, dok uterektomija produžava vek CL na nekoliko meseci – približno trajanje CL tada iznosi koliko i prosečan graviditet, tj. oko 148 dana. Kada se izvrši parcijalna uterektomija efekat zavisi od toga koji je deo uterusa uklonjen i gde se nalazi CL (na kom jajniku). Ako je uklonjen ipsilateralan materični rog (sa iste strane gde je jajnik sa CL), život CL je produžen na oko 35 dana (dvostruko duže u odnosu na normalan period trajanja privremenog CL kod ovaca). Međutim, ako se ukloni kontralateralni materični rog

gotovo da nema značajnog efekta na trajanje CL. Efekti totalne ili parcijalne uterektomije su prikazani na slici 1.



Slika 1. Efekti totalnog i parcijalnog uklanjanja uterusa kod ovaca na opstanak žutog tela (Modifikovano prema McDonad's, 2003)

Na osnovu prethodno iznetih rezultata klasičnih ogleda sa totalnim ili parcijalnim uklanjanjem uterusa neminovno se došlo do zaključka da je faktor koji dovodi do luteolize poreklom iz uterusa. Takođe se jasno pokazalo da je ovaj faktor lokalnog karaktera i da svoj uticaj ostvaruje isključivo ako je uterus (ipsilateralni materični rog) u fiziološkoj vezi sa jajnikom (transplantacija jajnika u predeo vrata dovodi do očuvanja CL u trajanju od više nedelja).

Nakon višegodišnjeg intenzivnog istraživanja pokazalo se da je $PGF_{2\alpha}$ lokalni luteolitički faktor poreklom iz uterusa. Kod ljudi je za luteolizu takođe odgovoran $PGF_{2\alpha}$, ali se on ne stvara u uterusu veću samom žutom telu. Kod kuja

je pokazano da uterektomija ne prekida normalno odvijanje estrusnog ciklusa, tako da je lutealna faza podjednako trajanja bez razlike na stanje uterusa koji nema uticaja na luteolizu.

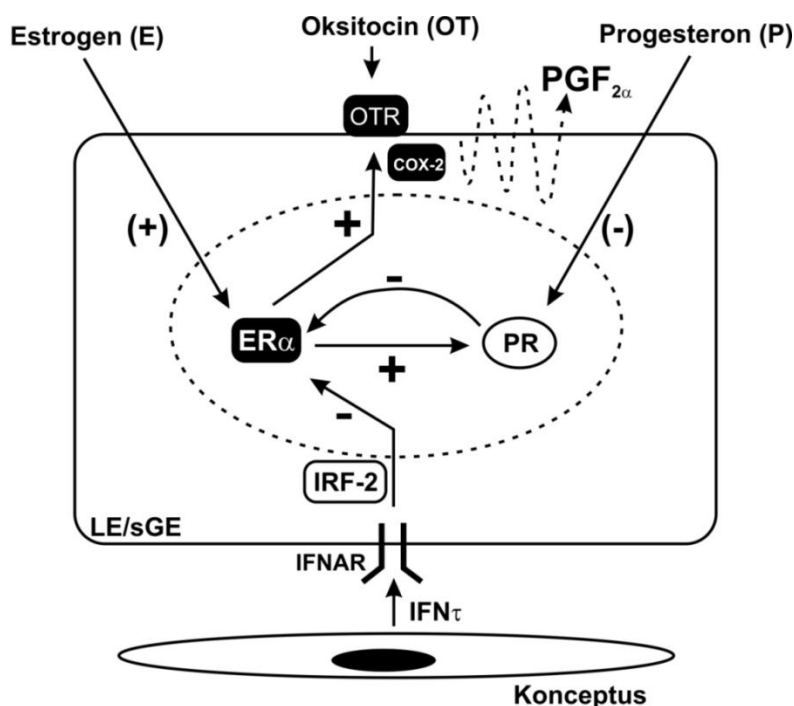
Materinsko prepoznavanje graviditeta kod preživara

Materinsko prepoznavanje graviditeta kod preživara (krave, ovce, koze) započinje u trenutku kada se blastocista oslobađa zone pelucide, postepeno povećava i izdužuje, pretvarajući se u filamentozni konceptus (12 dan od oplodnje kod ovaca ili 15 dan kod krava). Izduženi konceptus tada može po dužini zauzeti ceo materični rog, i većinom ga čini embrionalni omotač – trofoektoderm. Zanimljivo je da izduživanje konceptusa neće nastati u *in vitro* uslovima, ali će nakon njegovog smeštanja u uterus doći do elongacije (Flechon i sar. 1986).

Kod ovaca i krava utvrđeno je da blastocista sekretuje materijal koji blokira sintezu receptora za oksitocin u uterusu. To se dešava još u periodu kada nije došlo do implantacije i blastocista je slobodna u lumenu uterusa. Signalni molekul u ovom procesu je specifični protein koji je prvobitno nazvan ovčiji trofoblastni protein 1 (oTP-1) ili bovini trofoblastni protein 1 (bTP-1). Danas je ova supstanca svrstana u grupu proteina nazvanih interferoni. Većina interferona su nespecifični glikoproteini koje proizvode leukociti, fibroblasti, limfociti i ćelije trofoblasta. Interferoni imaju antivirusno dejstvo i utiču na brojne funkcije ciljnih ćelija. Budući da je oTP-1 (ili bTP-1) posebna vrsta interferona poreklom iz trofoblastnih ćelija on je još nazvan interferon tau (τ -tau; oIFN τ ; bIFN τ). Ovčiji IFN τ je protein relativno male molekulske mase (18-20 kDa) koga stvaraju ćelije trofoblasta blastociste i prisutni su u uterusu između 13-21 dana nakon ovulacije. Najveći obim sekrecije IFN τ je između 15-17 dana ciklusa, ali je prisutan i do 28 dana graviditeta (Bazer i sar., 1998). Kod preživara je identifikovano više vrsta IFN τ . Prema podacima iz 2000. godine utvrđeno je da postoji 18 prirodnih varijanti ovčijeg IFN τ i 12 varijanti govedeg IFN τ (Alexenko i sar., 2000). Sve vrste identifikovanih IFN τ imaju antivirusno dejstvo, ali je interesantno da postoje razlike u sposobnosti ovčijih IFN τ da spreče luteolizu kada se aplikuju u lumen uterusa negravidnih ovaca (Ealy i sar., 2001; Winkelman i sar., 1999). Ova činjenica mogla bi biti u osnovi pojave visokog stepena ranog embrionalnog uginuća kod goveda, pod uslovom da se utvrdi favorizovanje onih genotipova koji imaju manje aktivni IFN τ .

Interferon tau nema luteotropno dejstvo jer ne dovodi direktno do povišene sekrecije progesterona iz CL. Ključni efekat IFN τ ostvaruje se nakon njegovog dejstva na endometrijum gde dovodi do inhibicije sinteze receptora za oksitocin u endometrijalnim ćelijama. Pored toga, IFN τ se veže za apikalni deo uterušnih žlezda gde stimuliše sintezu proteina. Ovi proteini postaju sastavni deo sekreta koji je neophodan za opstanak embriona u periodu do implantacije.

Ogledi u kojima su upoređivani efekti intrauterine i sistemske aplikacije rekombinantnog IFN τ kod ovaca su pokazali da on smanjuje ekspresiju receptora za estrogene i oksitocin u uterusu. Delujući parakrinim mehanizmom IFN τ prevenira porast pulzatorne sekrecije PGF $_{2\alpha}$ nastale pod uticajem oksitocina i tako inhibira luteolizu (Spencer i sar., 1999). Tako se zadržava visok nivo sekrecije progesterona iz CL, pod čijim se uticajem povećava ekspresija proteina osteopontina koji se nalazi u ekstracelularnom matriksu. Smatra se da osteopontin ima ulogu u implantaciji embriona, verovatno kroz proces povezivanja proteina integrina prisutnog na ćelijama trofoektoderma sa luminalnom površinom endometrijuma (Johnson i sar., 2001).



Slika 2. Mehanizam hormonalne regulacije luteolize i antiluteolitičkog delovanja konceptusa na endometrijum kod preživara; objašnjenje u tekstu (modifikovano prema Spencer-u i sar., 2004).

Interferon tau deluje prema parakrinom principu na endometrijum (luminalni endometrijum, LE) i površinski sloj epitela materičnih žlezda (superficialni glandularni epitel, sGE), dovodeći do supresije transkripcije receptora za estradiol (ER α) i oksitocin (OTR) (Spencer et al., 1996; Fleming i sar., 2001). Na ovaj način se direktno inhibira mehanizam luteolize i omogućava

produženje životnog veka CL. Inhibirajući porast ekspresije receptora za oksitocin IFN τ onemogućava porast sekrecije PGF $_{2\alpha}$. Interesantno je, međutim, da IFN τ ne inhibira bazalnu produkciju PGF, koja je čak viša kod gravidnih ovaca u odnosu na negravidne, kao i da ne utiče na ekspresiju enzima ciklooksigenaze (COX-2) u endometrijalnim ćelijama gravidnih ovaca (Charpigny i sar., 1997). Stoga je antiluteolitički efekat IFN τ u prvom redu zasnovan na inhibiciji ekspresije receptora za estrogene i oksitocin.

Za vreme estrusa i metestrusa oksitocinski receptori (OTR) su prisutni na endometriju (LE) i glandularnom epitelu (sGE), budući da je nivo estrogena visok i pozitivno deluje na ekspresiju gena za estrogenske (ER α) i oksitocinske receptore. Tada su na endometriju prisutni i progesteronski receptori (PR), ali je nivo progesterona u cirkulaciji još uvek nedovoljan da aktivira dovoljan broj PR kako bi tim putem došlo do supresije sinteze ER α i OTR. Tokom ranog diestrusa nivo estrogena i ER α je nizak, ali se postepeno povećava nivo progesterona poreklom iz novoformiranog CL. Progesteron deluje na endometriju preko svojih receptora (PR) i dovodi do supresije sinteze ER α i OTR tokom narednih 8-10 dana. Kontinuirano delovanje progesterona na PR u endometrijalnim ćelijama na kraju dovodi do fenomena down-regulation između 11-12 dana estrusnog ciklusa ovaca. Gubitak PR prekida progesteronski blok za sintezu ER α i OTR, tako da se estrogenski receptori pojavljuju 11-12 dana posle estrusa, da bi se već 13-14 dana od estrusa pojavili i oksitocinski receptori. Povećanje ekspresije OR je olakšano porastom sekrecije estrogena iz rastućih folikula. Oksitocin se povišeno oslobađa iz zadnjeg režnja hipofize i CL počevši od 9 dana od estrusa, kako kod gravidnih tako i kod negravidnih ovaca. Kod negravidnih ovaca OT se veže za OTR u endometrijalnim ćelijama i preko dejstva enzima COX-2 povećava sekreciju PGF $_{2\alpha}$ koji deluje luteolitički. Kod gravidnih ovaca, međutim, ćelije trofoektoderma luče IFN τ počevši od 10 dana po oplodnji, i on deluje antiluteolitički. Interferon tau se vezuje za svoje receptore (IFNAR) na ćelijama endometrija, gde inhibira transkripciju gena za estrogenske receptore (ER α) preko signalnog puta koji uključuje IFN regulatorni faktor 2 (IRF-2). Takođe se sprečava formiranje receptora za oksitocin i dolazi do izostanka luteolize, očuvanja CL i uspešnog graviditeta.

Materinsko prepoznavanje graviditeta kod drugih vrsta

Materinsko prepoznavanje graviditeta kod krmača ima dve ključne razlike u odnosu na ovaj proces kod ovaca i krava. Kao prvo, konceptus kod krmača proizvodi polni hormon estradiol koji je bitan za materinsko prepoznavanje graviditeta. Drugo, endometrijum kod krmača proizvodi značajnu količinu PGF $_{2\alpha}$, ali je njegovo lučenje preusmereno u lumen uterusa umesto prema krvnim sudovima. Konceptus krmača sekretuje estradiol 11-12 dana nakon ovulacije. Proizvodnja estrogena ne dovodi do inhibicije sinteze PGF $_{2\alpha}$, već dovodi do usmeravanja sintetisanih prostagladina prema lumenu uterusa umesto

u pravcu kapilarne mreže submukoze uterusa. Prostaglandini koji su dospeli u lumen uterusa ne mogu doći do CL jer nemaju pristup cirkulaciji pa tako izostaje luteoliza. Ovaj mehanizam preusmeravanja sekrecije prostaglandina još uvek nije sasvim razjašnjen. Takođe se smatra da estrogeni povećavaju sintezu receptora za prolaktin u endometriju. Prolaktin dovodi do promena u kretanju jonskog kalcijuma, a smatra se da ova promena utiče na stimulisanje egzokrine sekrecije $PGF_{2\alpha}$ u odnosu na endokrini mehanizam sekrecije (u pravcu krvnih sudova). Plodovi kod krmača sekretuju interferon ali on nema uticaja na aktivnost i trajanje žutog tela. Sekrecija estradiola od strane plodova kod krmače ne samo da služi kao ključni signal koji je odgovoran za materinsko prepoznavanje graviditeta već verovatno ima značajan uticaj na stimulaciju kontrakcija miometrija. Ove kontrakcije su bitne za pravilno raspoređivanje plodova u materičnim rogovima krmače.

Još jedna značajna karakteristika materinskog prepoznavanja graviditeta kod krmača leži u činjenici da moraju postojati najmanje po dva ploda u svakom materičnom rogu da bi se ostvarila uspešna gestacija. Ukoliko u jednom materičnom rogu nema prisutnih plodova doći će do lučenja $PGF_{2\alpha}$ tako da će se on naći u krvotoku, izazvati luteolizu i doći će do prekida graviditeta.

Materinsko prepoznavanje graviditeta kod žena zasniva se na sekreciji hormona koji se naziva humani horionski gonadotropin (hCG). Plod kod ljudi u vreme implantacije (7-9 dana posle ovulacije) sintetiše i luči hCG, koji ima efekat sličan luteinizirajućem hormonu (LH) iz adenohipofize. Tačan mehanizam kako hCG blokira luteolizu nije još uvek sasvim poznat, ali je luteotropni efekat dovoljan da omogući implantaciju i očuvanje graviditeta.

Proteini placente kao markeri graviditeta

Zanimljivo je da se u toku formiranja placente za vreme ranog graviditeta kod preživara u krvi gravidnih životinja pojavljuju proteini koji mogu poslužiti kao markeri graviditeta. U toku razvoja placente pojavljuju se džinovske binuklearne ćelije, koje su poreklom iz trofoblasta i migriraju u endometriju, gde se fuzijom pretvaraju u trinuklearne ćelije. Za vreme fuzije binuklearnih ćelija one izlučuju sadržaj citoplazmatskih granula koje sadrže specifične proteine (*bovine pregnancy specific proteins*, BPSP), koji se još nazivaju bPAG (*bovine pregnancy associated glycoproteins*). Džinovske binuklearne ćelije kod krava se javljaju između 18-20 dana od oplodnje, a kod ovaca 14. dana nakon koncepcije. To ne znači da ove ćelije nestaju iz placente nakon određenog vremena, već naprotiv, one se obnavljaju tokom graviditeta i kod preživara čine oko 20% svih ćelija placente. U njima se takođe intenzivno odvija steroidogeneza pri čemu nastaju progesteron i estrogen (Zoli i sar., 1992; Beckers i sar., 1995; Szenci i sar., 1998; Noakes i sar., 2008).

Detaljna istraživanja molekularne biologije PAG su ukazala da tokom različitih faza graviditeta pojavljuju različite podvrste PAG. Tako se u krvi govoda PAG 1, 6 i 7 javljaju u sredini i tokom kasnog graviditeta, dok se bovini PAG 2, 3, 4 i 5 javljaju na samom početku, već oko 25. dana gravidnosti. (Garbayo i sar. 2000; Green i sar. 2000). Kod onih vrsta domaćih životinja koje imaju *placentu epithiochorialis* kao što su kobilica i krmača javlja se samo eqPAG-1, poPAG-1, poPAG-2 i to na površini horiona (Green i sar., 1999). U svojim istraživanjima Del Vecchio i sar., (1990, 1995) su dokazali da PAG stimuliše lutealnu funkciju i utiče na porast koncentracije progesterona u krvnom serumu. Ogladi *in vitro* pokazali da PAG 1 deluje na koncentraciju PGF_{2α}, PGE₂ i oksitocina i time indirektno utiče na blokadu luteolize.

Određivanje koncentracije PAG u krvnom serumu može da se koristi u ranoj dijagnostici graviditeta kod krava. Postoje podaci da je ova metoda visoko pouzdana (100%) ako se primenjuje nakon 27 dana graviditeta (Mialon i sar., 1993), dok jedan broj autora navodi da je tako visoka pouzdanost tek nakon 30 dana gestacije (Humblot i sar., 1988; Delahaut i sar., 1996). Po svemu sudeći određivanje koncentracije PAG u krvnom serumu krava nakon 24 dana graviditeta bi trebalo da daje pouzdan rezultat u preko 90% slučajeva, sa još boljim rezultatima u slučaju determinisanja negravidnih životinja (Prvanović i sar., 2009).

Literatura:

1. Alexenko AP, Ealy AD, Bixby JA, Roberts RM, 2002, A classification for the interferon- τ , *J Interferon Cytokine Res*, 20, 817-822.
2. Bazer FW, Ott TL, Spencer TE, 1998, Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in subprimate mammals, In: Bazer FW, ed. *Endocrinology of pregnancy*, 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press; 1-34.
3. Beckers JF, Roberts RM, Zoli AP, Ectors F, Derivaux J, 1995, Molekules de la famille des proteases aspartiques dans le placenta des ruminants: hormones ou proteines? *Bull Mem Acad Roy Med Belgique*, 149, 355-367.
4. Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Martal J, Maclouf J, Guillomot M, 1979, Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy, *Endocrinology*, 138, 2163-2171.
5. Del Vecchio RP, Sasser RG, Rander RD, 1990, Effect of pregnancy specific protein B on PGF_{2α} and PGE₂ release ba day 16-perfused bovine endometrial tissue, *Prostaglandins* 40(3), 271-282.
6. Del Vecchio RP, Sutherland VD, Sasser RG, 1995, PGF_{2α}, progesterone and oxytocin production by cultured bovine luteal cells treated with

- prostaglandin E2 and pregnancy specific protein B, *Prostaglandins*, 50, 137-150.
7. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM, 2006, Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions, *Anim Reprod Sci*, 96, 297–311.
 8. Ealy AD, Larson SF, Liu L, Alexenko AP, Winkelman GL, Kubisch HM, Bixby JA, Roberts RM, 2001, Polymorphic forms of expressed bovine interferon-t genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products, *Endocrinology*, 142, 2906–2915.
 9. Flechon JE, Guillomot M, Charlier M, Flechon B, Martal J, 1986, Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst, *Reprod Nutr Dev*, 26, 1017–1024.
 10. Fleming JA, Choi Y, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW, 2001, Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau, *Endocrinology*, 142, 2879-2887.
 11. Garbayo JM, Remy B, Alabart JL, Folch J, Wattiez R, Beckers JF, 1997, Isolation and characterisation of a caprine pregnancy associated glycoprotein (cPAG), *Biol Reprod*, 56 (suppl. 1), 89.
 12. Green JA, Szafranska B, Gan X, Newman AG, McDowell K, Roberts RM, 1999, Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta, *Biol Reprod*, 60, 1069-1077.
 13. Green JA, Xie SI, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF, Roberts RM, 2000, Pregnancy associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy, *Biol Reprod*, 62, 1624-1631.
 14. Humblot P, 2001, Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants, *Theriogenology*, 56, 1417–1433.
 15. Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt RC, 2001, Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep, *Biol Reprod*, 65, 820–828.
 16. Noakes ED, Parkinson JT, England CVG, 2008, *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, ISBN 9780702025563.
 17. Prvanović N, Tomasković A, Grizelj J, Kocila P, Samardžija M, 2009, Monitoring of early pregnancy and early embryonic mortality by ultrasound and determination of pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in cows, *Vet Arch*, 79, 259-267.
 18. Spencer TE, Bazer FW, 1996, Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium, *Endocrinology*, 137, 1144-1147.

19. Spencer TE, Stagg AG, Ott TL, Johnson GA, Ramsey WS, Bazer FW, 1999, Differential effects of intrauterine and subcutaneous administration of recombinant ovine interferon tau on the endometrium of cyclic ewes, *Biol Reprod*, 61, 464–470.
20. Szenci O, Beckers JF, Sulon J, Sasser RG, Taverne MAM, Varga J, Baltusen R, Schekk Gy, 1998, Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy specific protein B and bovine pregnancy associated glycoprotein test for pregnancy detection in dairy cows, *Theriogenology*, 50(1), 77-88.
21. Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK, 2001, Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle, *Theriogenology*, 56, 1435–1450.
22. Winkelman GL, Roberts RM, James Peterson A, Alexenko AP, Ealy AD, 1999, Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the periimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities, *Biol Reprod*, 61, 1592–1600.
23. Zoli A, Guibault P, Delahaut LA, Benitez P, Ortiz W, Beckers JF, 1992, Radioimmunoassay of a bovine pregnancy associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis, *Biol Reprod*, 46(1), 83-92.

KLINIČKA PROCENA MALIGNITETA TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KUJA

CLINICAL ASSESSMENT OF MALIGNANT TUMORS OF MAMMARY GLAND IN BITCHES

Magaš Vladimir, Đurić Miloje, Maletić Milan

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Kratak sadržaj

Izučavanje problematike tumora mlečne žlezde kuja je od posebnog interesa kako za humane, tako i za veterinarske onkologe, što se poslednjih godina uočava kroz porast broja eksperimentalnih istraživanja u ovoj oblasti.

Adekvatan klinički pregled i klinička procena omogućavaju rano dijagnostikovanje, pravilan pristup i tretman ovog oboljenja. Prepoznavanje indikacija za odstranjivanje tumora mlečne žlezde i primena odgovarajuće hirurške metode, preduslov su za postavljanje tačne dijagnoze i prognoze i sprovođenje postoperativnog tretmana. Za potvrdu dijagnoze koriste se detaljna histopatološka i imunohistohemijska ispitivanja koja uz to omogućavaju i tačnu klasifikaciju, procenu invazivnosti i prognozu ovih tumora.

Klinička procena kuja sa tumorima mlečne žlezde zahteva poznavanje sledećih elemenata: anamnestičkih podataka, vremenskog trajanja promena na mlečnim žlezdama, stepena rasta neoplazme, veličine tumora, lokalizacije tumora, broja zahvaćenih mamarnih kompleksa, konzistencije tumora, načina rasta, prisustva ulceracija, fiksiranosti za kožu ili telesni zid, uvećanja regionalnih limfnih čvorova, deformiteta bradavica i prisustva udaljenih metastaza.

Anamnestički podaci obuhvataju određivanje rase, starosti, reproduktivne istorije i opšteg stanja životinje. Trenutno zdravstveno stanje može odrediti vrstu tretmana, odnosno, da li će tretman biti potpun i ukoliko jeste, koliko će tretman biti agresivan. Prethodna odstranjivanja tumora mlečne žlezde - recidivi su značajan podatak koji se takođe mora imati u vidu.

Ključne reči: mlečna žlezda, tumor, kuje, klinička procena.

Summary

Research of mammary gland tumors is, same as in human medicine, very important for veterinary oncologist, and number of experimental researches is constantly rising in last few years.

Clinical exam and evaluation is key point in early diagnostic of tumors and choice of treatment. Diagnosis, prognosis and post-surgical treatment depend on recognizing indications and choice of surgical treatment. Histopathological and immunohistochemical examination, beside diagnosis, are important for classification, evaluation of invasive growth and prognosis.

Clinical evaluation of bitches with mammary gland tumor includes anamnestic data of patient as well as period of time after first signs, degree of neoplastic growth, number of complexes, size, number and localization of tumors, consistency, ulcers, is it fixed or not, size of lymph nodes and metastasis.

Anamnestic data includes breed, age, reproductive history and condition of patient. Health status of animal determining treatment, for how long and how aggressive it should be. Important information is earlier surgical removal of mammary glands – recidive.

Key words: *mammary gland, tumors, bitches, clinical assessment.*

Ispitivanje i lečenje malignih oboljenja predstavljaju veoma kompleksne i aktuelne poduhvate u savremenoj medicini koji zahtevaju multidisciplinarni pristup. Maligna oboljenja životinja i ljudi praćena su velikim mortalitetom i zbog toga su još uvek najveći problem u veterinarskoj i humanoj medicini. Dugogodišnja proučavanja i posmatranja malignih procesa, omogućila su razumevanje njihovih osnovnih i specifičnih karakteristika. To su: sposobnost proliferacije i davanja metastaza, invazivnost, i autonomnost.

Tumori mlečne žlezde su česte neoplazije kod različitih vrsta, a najčešće su kod pasa, miševa, pacova i ljudi. S druge strane ekstremno retko se sreću kod biljojeda. Po učestalosti pojavljivanja, tumori mlečne žlezde pasa se nalaze odmah iza tumora kože, a istovremeno predstavljaju najčešće neoplazme kod kuja.

Adekvatan klinički pregled i klinička procena omogućavaju rano dijagnostikovanje, pravilan pristup i tretman ovog oboljenja. Prepoznavanje indikacija za odstranjivanje tumora mlečne žlezde i primena odgovarajuće hirurške metode, preduslov su za postavljanje tačne dijagnoze i prognoze i sprovođenje postoperativnog tretmana. Za potvrdu dijagnoze koriste se detaljna histopatološka i imunohistohemijska ispitivanja koja uz to omogućavaju i tačnu klasifikaciju, procenu invazivnosti i prognozu ovih tumora. Histološka slika, pre svega malignih mamarnih tumora kuja, odlikuje se izuzetnim polimorfizmom i u ovoj žlezdi se javljaju morfološki i histogenetski veoma različiti tumori.

Svi tumori, i benigni i maligni imaju dve komponente: proliferirajuće tumorske ćelije, koje predstavljaju parenhim, i stromu koja se sastoji iz vezivnog

tkiva i krvnih sudova. Iako su proliferirajuće ćelije te koje predstavljaju neposrednu opasnost, nastanak i razvoj tumora zavisi od njegove strome, pri čemu vezivno tkivo daje potporu ćelijama tumora, a ishrana putem krvi je uslov za njihov opstanak.

Benigni tumori su najčešće dobro inkapsulirani i ostaju unutar vezivno-tkivne kapsule, odnosno ne mogu da se šire po organizmu (ne metastaziraju) i građeni su od ćelija koje su dobro diferencirane. Maligni tumori su po pravilu invazivni, urastaju i uništavaju okolno tkivo. Česte su metastaze u okolne limfne čvorove i udaljene organe. Diferencijacija je često nepotpuna (anaplastična), tumorske ćelije su često pleomorfne (različitog oblika i veličine), jedra pleomorfna, hiperhromatična i velika u poređenju sa ćelijom. Mitotične figure su brojne i često nepravilne.

Razlikovanje benignih od malignih tumora samo na bazi morfoloških osobenosti je veoma teško. Ovo se posebno odnosi na tumore koji retko ili tek posle dužeg vremena metastaziraju, zatim na tumore koji zbog urastanja u vitalne strukture tkiva (lokalna malignost) brzo dovode do smrti ili eutanazije i kod tumora koji brzo prognozuju smrt jer proizvode velike količine hormona ili drugih biološki aktivnih materija (paraneoplastični sindromi). Problem u diferencijaciji je uočljiv i kod tumora gde je izražena inflamatorna komponenta. Kod nekih tumora histološka slika se ne poklapa sa kliničkom slikom.

Učestalost pojavljivanja tumora mlečne žlezde pasa

U patologiji mlečne žlezde kuja najčešće bolesti su: zapaljenja (mastitisi), aplazije, hipoplazije, hiperplazije i tumori. Mastitisi se kod kuja javljaju relativno retko u poređenju sa pojavljivanjem kod krava, dok su neoplazme mlečnih žlezda kod kuja relativno česte, naročito kod starijih životinja.

Tumori mlečne žlezde se po učestalosti kod pasa oba pola, nalaze na drugom mestu, odmah iza tumora kože. Istovremeno predstavljaju najčešće neoplazije kod kuja, što ukazuje da je u razvoju tumora mlečne žlezde pol važan predilekcionni faktor. Oboljenje se javlja izuzetno retko i kod mužjaka, približno 1% i to najverovatnije kao posledica hormonalnih poremećaja u smislu povećane proizvodnje estrogena od strane tumorozno promenjenih Sertoli ćelija. Tumori mlečne žlezde kod mužjaka imaju tendencu visokog maligniteta i lošije su prognoze. Prosečna učestalost tumora mlečne žlezde u odnosu na pojavljivanje svih ostalih tumora kod pasa kreće se u intervalu od 25 do preko 50%. Izveštaji pojedinih autora razlikuju.

Etiologija i faktori rizika

Iako uzrok mamarnih neoplazija još uvek nije rasvetljen, do sada su pored uloge virusa, proučavani hormonalni i genetički uticaji, kao i uticaj ishrane. Za tumore mlečne žlezde se pretpostavlja da su na neki način zavisni od hormona a

posebno progesterona. Uočen je i intenzivniji rast mamarnih neoplazija za vreme estrusa i metestrusa.

Izgleda da postoje uticaji i genetskih faktora na nastanak mamarnih tumora, pa otuda rasne - čistokrvne kuje i kuje koje su familijarno predisponirane imaju veći rizik za nastanak mamarnih tumora od mešanaca. Slično je i kod žena koje su u porodičnoj anamnezi imale tumor dojke, pa spadaju u grupu visokog rizika za nastanak tumora.

Ishrana bogata mastima kod laboratorijskih životinja a i kod žena, često se povezuje sa povećanim rizikom nastanka mamarnih neoplazija.

Endokrinološki status kuje

Sterilizacija kuja igra važnu ulogu u profilaksi pojave i razvoja mamarnih neoplazija. Mnogi eksperimenti su potvrdili da su tumori mlečne žlezde izrazito hormon zavisni i da ovariohisterektomija značajno smanjuje rizik nastanka tumora mlečne žlezde. Činjenica da ovariektomija pokazuje pozitivne protektivne efekte na pojavu neoplazija mlečne žlezde kuja ako se uradi u starosti od 6 do 30 meseci, a da mamarni tumori ukoliko se i razviju, najčešće mogu biti uočeni tek za nekoliko godina od posebnog je praktičnog značaja. To sve ukazuje na multifaktorijalne uzroke i/ili veoma dug latentni period neophodan za razvoj ovog oboljenja.

Mnogi istraživači ukazuju da su tumori mlečne žlezde povezani sa endokrinim poremećajima kao što su nepravilan estralni ciklus, folikularne ciste jajnika, perzistentno žuto telo, hiperplastični endometrijum, pseudogruviditet i piometra

Starosna, rasna i familijarna predizpozicija za tumore mlečne žlezde kuja

Starost kuja igra važnu ulogu u pojavi i razvoju tumora mlečne žlezde. Rizik za pojavu tumora značajno se povećava sa starošću životinje. Najveća učestalost tumora mlečne žlezde zabeležena je kod kuja starih između 10-11 godina, a nakon tog starosnog doba učestalost ovih neoplazija opada. Tumori mlečne žlezde su izuzetno retki kod životinja mlađih od dve godine, a nagli skok učestalosti pojave tumora počinje oko šeste godine, što se označava kao početak "kancerskog doba". Pored toga ustanovljeno je da starije kuje imaju veći broj malignih tumora, a otkriveno je da postoje razlike i u veličini tumora u odnosu na starosne grupe.

Do sada nije sa sigurnošću utvrđena specifična rasna predispozicija za pojavu tumora mlečne žlezde, ali postoje podaci da se ovi tumori češće javljaju kod pudli, foks i boston terijera, koker španijela, nemačkih ovčara, labrador retrivera, erdel terijera, engleskih i irskih seterica i poentera. Nasuprot njima, kod čivava i boksera tumori mlečne žlezde se izuzetno retko javljaju. Takođe je zapažen i manji rizik za pojavu benignih tumora kod pasa rase koli i svih tipova tumora mlečne žlezde kod mešanaca. Primećeno je i da su tumori mlečne žlezde

kod nemačkih ovčarki pokazivali veći stepen maligniteta u poređenju sa drugim rasama.

Pored rasne uočena je i familijarna predispozicija koja se nasleđuje po muškoj liniji.

Malignitet tumora mlečne žlezde i metastaze

Teško je odrediti tačan procenat benignih u odnosu na maligne tumore, kako na osnovu kliničkih ispitivanja, tako i na osnovu patohistoloških nalaza, jer većina malih benignih lezija kod starijih pasa nikada nije bila podvrgnuta ispitivanjima.

Podaci koji se odnose na procenat učestalosti pojavljivanja malignih tumora mlečne žlezde variraju zbog različitih načina klasifikacije tumora posebno u pogledu odvajanja mešovityh tumora od karcinoma mlečne žlezde.

Krajnja procena maligniteta oboljenja predstavljaju metastaze, nastale bilo lokalnom infiltracijom ili širenjem na udaljene lokacije. Metastaze mamarnih tumora kod pasa najčešće se sreću na plućima i regionalnim limfnim čvorovima. Međutim, metastaze se mogu javiti i na drugim organima uključujući kosti, mozak, jetru, slezinu, bubrege i kožu. Ova mesta metastaza ukazuju da su u metastatsko širenje uključeni i limfni i vaskularni putevi. Metastaze su najčešće davali sarkomi (oko 75%) i karcinomi (oko 30%).

Plućne metastaze su česte i toj činjenici treba posvetiti punu pažnju. One obično ne izazivaju kliničke znake sve dok tumori pluća ne dostignu značajnu veličinu. Širenje na regionalne limfne čvorove i udružene duboke čvorove kao što je duboki ingvinalni, takođe je često. Regionalni limfni čvor za prva tri kranijalna mamarna kompleksa je aksilarni limfni čvor, a za dva kaudalna mamarna kompleksa je superficijalni ingvinalni limfni čvor. Od značaja može biti i potencijalno širenje tumora na kosti, što se obično previdi u kasnim stadijumima bolesti ukoliko se ne uradi rutinski radiografski pregled kostiju.

Klinička slika tumora mlečne žlezde

Prema kliničkom stepenu razvoja, ova oboljenja se mogu podeliti na lokalna (nalaze se samo u mamarnom tkivu), regionalna (nalaze se u mamarnom tkivu i primarnim regionalnim limfnim čvorovima) ili diseminirana (metastaze na drugim organima).

Iako histološka determinacija neoplazmi ima najvažniji dijagnostički i prognostički značaj, određivanje karakteristika tumora mlečne žlezde kuja putem kliničkog pregleda, takođe daje informacije korisne za dalji tretman i prognozu bolesti.

Klinička procena kuja sa tumorima mlečne žlezde zahteva poznavanje sledećih elemenata: anamnestičkih podataka, vremenskog trajanja promena na mlečnim žlezdama, stepena rasta neoplazme, veličine tumora, lokalizacije tumora, broja zahvaćenih mamarnih kompleksa, konzistencije tumora (meko ili

tvrda), načina rasta (ekspanzivan, umereno infiltrativan, jako infiltrativan), prisustva ulceracija, fiksiranosti za kožu ili telesni zid, uvećanja regionalnih limfnih čvorova, deformiteta bradavica i prisustva udaljenih metastaza.

Anamnestički podaci obuhvataju određivanje starosti, rase, reproduktivne istorije i opšteg stanja životinje. Trenutno zdravstveno stanje može odrediti vrstu tretmana, odnosno, da li će tretman biti potpun i ukoliko jeste, koliko će tretman biti agresivan. Prethodna odstranjivanja tumora mlečne žlezde - recidivi, su značajan podatak koji se takođe mora imati u vidu.

Stepen rasta tumora ima bitan prognostički značaj i generalno posmatrano, sporo rastući tumori imaju bolju prognozu. Uobičajeno je da veterinari savetuju što raniji hirurški tretman u slučajevima brzog rasta tumora, dok se sporo rastuće neoplazme ne terpiraju dok ne postanu dovoljno velike.

Veličina i volumen tumora takođe imaju prognostički značaj. Uopšteno gledano, maligni tumori su veći nego benigni. Veličina tumora od 3-5 cm, kao i tumori veći od 5 cm, imaju lošiju prognozu od tumora manjih od 3 cm. Većina malih mamarnih tumora predstavlja slučajan nalaz u toku rutinskog kliničkog pregleda koji je bio povezan sa drugim problemima. Recidivi tumora koji su manji od 3 cm u prečniku se javljaju u 35% slučajeva, za razliku od tumora većih od 3 cm, kod kojih se recidivi javljaju u 75% slučajeva.

Lokalizacija tumora na samim mlečnim žlezdama izgleda da ne utiče na stepen maligniteta. Kuje imaju pet pari mamarnih kompleksa ali se tumori najčešće sreću na zadnja dva kaudalna para (oko 65%), dok je prvi mlečni kompleks najređe zahvaćen, za razliku od mačaka, kod kojih su kranijalne žlezde najčešće mesto za razvoj tumora. Kao jedan od razloga za češće javljanje tumora u kaudalnim kompleksima navodi se duže zadržavanje sekretorne aktivnosti i veća osetljivost na estrogene u ovim kompleksima. Anatomska raspodela ukazuje na vezu između pojave mamarnih neoplazija i veličine mlečnih žlezda. Lokalizacija tumora u pojedinim mamarnim kompleksima nema prognostički značaj.

Kliničko ispoljavanje mamarnih neoplazija može se klasifikovati kao pojedinačno ili multipno na jednom ili na oba lanca mamarnih kompleksa. Kod kuja se obično sreću multipni noduli, iako neke jединke mogu imati i pojedinačne tumore. Kod kuja je opisana visoka frekventnost multipnih mamarnih tumora, a u nekim izveštajima multipna zastupljenost se javlja od 50 do 65%. Dok se multipna lokalizacija tumora može smatrati kao simultana refleksija na primarne neoplazije istog ili različitog histološkog tipa, širenje malignih tumora može da se javi ili direktnim ili metastatskim putem.

Način rasta i stepen invazije kože i telesnog zida može biti jedan od najbitnijih prognostičkih faktora kod tumora mlečne žlezde kuja. Ekspanzivni cirkumskriptni tumori ili tvorevine imaju znatno duže vreme postoperativnog preživljavanja nego infiltrativne neoplazme sa nepravilnim granicama.

Pojava ulceracija na neoplazijama mlečne žlezde smanjuje verovatnoću prolongiranog postoperativnog preživljavanja. Kliničko ispoljavanje inflamatornog mamarnog karcinoma je veoma dramatično. U većini slučajeva postoje površinske ulceracije i krvarenje sa površine. Ovi tumori često mogu biti zamenjeni sa perakutnim mastitisom.

Otkriveno je da ne postoji veza između rasta u limfnim sudovima i uključenosti regionalnih limfnih čvorova pre intervencije, što predstavlja interesantnu opservaciju s obzirom na dobro poznatu činjenicu loše prognoze kod žena kod kojih su tumori nađeni u limfnim sudovima i limfnim čvorovima. Snažan limfedem zbog lokalne opstrukcije limfotoka ima izuzetan značaj za kliničare zbog toga što može da odredi dalji tretman neoplazme. Nije zabeleženo da uključenost bradavica u neoplazme mlečne žlezde menja i prognozu kod istih. Pažljiva i dalekovidna klinička istraživanja omogućavaju dodatne informacije o faktorima rizika koji utiču na prognozu ovih patoloških promena.

Važni prognostički klinički znaci odnose se na: zahvaćenost kože iznad tumora, zahvaćenost fascije koja se nalazi ispod tumora, prisustva ulceracija na koži i lokalnu diseminaciju.

Od posebnog značaja su tumori koji se karakterišu difuznim crvenilom, pruritusom i edemom mamarnog tkiva, a verovatno i ekstremiteta. Ovi tumori su generalno uzevši veoma agresivni, duboko invadiraju dermalne limfatične strukture, a histološki su najčešći anaplastični karcinomi. Oni se brzo šire i predstavljaju najčešći tip tumora kod žena. Prognoza kod standardne terapije za opstanak na duže vreme kod kuja je loša.

U cilju ranog otkrivanja neoplazija mlečne žlezde, neophodno je da se palpira svaki mamarni kompleks i svaka bradavica, ingvinalni limfni čvorovi, područja aksilarnih limfnih čvorova i abdomen. Životinje sa tumoroznim masama, iscetkom iz bradavica, ili uvećanim superficijalnim ingvinalnim limfnim čvorom treba detaljnije pregeledati. Diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze mastitisi, galaktostaza i hiperplazija mlečne žlezde. Otežan hod, bol, neurološki, respiratorni simptomi ili drugi klinički znaci koji se zapažaju tokom kliničkog pregleda, mogu ukazivati na uznapredovalo oboljenje i malignu alteraciju, što zahteva dodatna ispitivanja.

Potrebno je uraditi elektrokardiogram za svakog pacijenta pre nego što se izabere metod tretmana. Rutinski laboratorijski testovi kod pasa u okviru tretmana mamarnih tumora treba da uključuju kompletan pregled krvne slike, određivanje koncentracije ukupnih proteina kao i bihemijski pregled krvi i urina.

U proceni rasprostranjenosti oboljenja bitna je radiografija toraksa i abdomena zajedno sa adekvatnim ispitivanjem drenažnih limfnih čvorova i ostalih čvorića koji se nađu u koži i drugim tkivima. Standardna ventrodorzalna i lateralna radiografija toraksa treba da predstavlja rutinsku metodu u pretretmanu kuja sa mamarnim neoplazijama, zbog toga što navedena područja predstavljaju mesta sa najvećim procentom javljanja metastaza. Druga područja

takođe mogu da zahtevaju radiografsku procenu (kičmeni stub, duge kosti ili abdomen) ukoliko klinički znaci ukazuju na moguću patologiju.

Kod mamarnih neoplazija postoji više načina identifikacije tipa tumora i njegove anatomske rasprostranjenosti. Identifikacija oboljenja najčešće se izvodi citološkim ili histološkim pregledom. Tkivo za citološki pregled može se uzeti bilo incizijom bilo ekscizijom biopsijom. Prehirurška incizionna biopsija može biti indikovana ukoliko postoje veliko crvenilo, pruritus i/ili edem.

Biopsija se može izvesti i kao "fine-needle" aspiracija. Pri tome aspiracija treba da se izvrši sa više mesta kako bi se povećala verovatnoća za postavljanje definitivne dijagnoze. Kolekcija "fine-needle" tehnikom je jednostavna, relativno bezbolna, brza i ne zahteva specijalnu opremu. Međutim, tumori mamarnih žlezda generalno ne predstavljaju solidne mase kancerogenih ćelija i ne možemo biti sigurni da identifikovane ćelije u razmazu potiču iz najagresivnije oblasti tumora. Zbog toga negativan ili benigni izgled aspiriranog citološkog preparata ne isključuje mogućnost greške uzorka. Osim toga, citološka procena tkiva mlečne žlezde je teška i zahteva iskusne citopatologe u većini slučajeva.

Klasifikacije tumora mlečne žlezde

U veterinarskoj onkologiji jedan od velikih problema predstavlja histopatološka klasifikacija tumora mlečne žlezde. Razloge treba tražiti u različitoj morfologiji ovih tumora i proceni njihovog prognostičkog značaja, kao i u različitom pristupu izradi klasifikacije.

Histološka klasifikacija tumora mlečne žlezde pasa i mačaka objavljena je 1999. godine u WHO biltenu. Ova klasifikacija sadrži i prognozu zasnovanu na histološkom izgledu i tipu tumora. Na osnovu rezultata statističkih studija, autori su karcinome klasifikovali u jedan niz sa rastućim malignitetom.

Na početku tog niza nalaze se neinfiltrirajući karcinomi, potom slede kompleksni karcinomi i prosti karcinomi. Prosti karcinomi imaju svoj rastući niz maligniteta; tubulopapilarni karcinom, solidni karcinom i anaplastični karcinom.

Na osnovu statističkih rezultata u ovoj studiji za najmalignije od svih tumora mlečne žlezde proglašeni su sarkomi.

Terapija tumora mlečne žlezde kuja

Optimalan tretman tumora mlečne žlezde za sada je još uvek kontroverzan i kod životinja i kod ljudi. Hirurški postupak je osnovni tretman u terapiji mamarnih neoplazija, opisan još 3000 godina p.n.e. u egipatskim zapisima. Smatra se da tip radikalne hirurgije nije najbitniji faktor u tretmanu oboljenja.

Neophodno je proceniti opšte stanje životinje, jer od toga zavisi koliko će tretman biti radikalan. Kao opšte hirurško pravilo preporučuju se radikalnije hirurške procedure kod zdravijih, mlađih pacijenata i konzervativnije procedure za pacijente koji su stariji i lošijeg zdravstvenog stanja.

Paraneoplastični sindrom predstavlja još jedan veoma važan element kome se u preoperativnom periodu mora posvetiti posebna pažnja, zbog mogućih neželjenih postoperativnih komplikacija. Paraneoplastični sindrom se definiše kao prateći udaljeni efekti neoplazme koji nisu povezani sa položajem, veličinom ili lokalizacijom primarnog tumora ili njegovih metastaza. Ovaj sindrom je povezan sa stvaranjem i eliminisanjem u cirkulaciju hormona odnosno polipeptida kao produkata tumora.

Ne postoje dokumentovani podaci da ovariohisterektomija ima uticaja na razvoj mamarnih tumora kod pasa ukoliko se izvrši nakon 2,5 godina starosti ili da ovariohisterektomija menja biloško ponašanje tumora nakon njegovog nastanka. Međutim, ukoliko se ovariohisterektomija izvede u vreme otklanjanja tumora, kliničar sprovodi korisnu profilaktičku proceduru s obzirom na potencijalna utero-vaginalna oboljenja, a može se pomoći i u odlaganju vremena nastanka metastaza.

Iako se istraživanja u vezi sa primenom hemoterapije, radijacione terapije, hormonske manipulacije i imunoterapije stalno obavljaju, za sada je hirurška metoda glavni i u našim uslovima najprihvatljiviji tretman ovog oboljenja.

Trenutno ne postoje rezultati koji bi dali definitivni odgovor o hemoterapeutskoj efikasnosti citotoksičnih preparata u terapiji tumora mlečne žlezde kuja. Njihova upotreba je još uvek eksperimentalna i to kako kod kuja sa znatno raširenim oboljenjem, tako i kod recidiva nakon hirurške intervencije.

Iako u veterinarskoj medicini postoji vrlo malo informacija o postojećim učincima radijacione terapije, kontrolisana upotreba radijacije u institucijama koje imaju adekvatnu opremu i iskustvo, može da se koristi u tretmanu neoperabilnih lokalnih i regionalnih mamarnih tumora, kao i inflamatornih karcinoma. Ona je korišćena sa uspehom u pre-operativnim situacijama, za redukciju tumorozne mase.

Hormonska terapija je zasnovana na postojanju estrogenih i progesteronskih receptora na površini tumorskih ćelija u većini benignih i malignih mamarnih neoplazija. Upotreba tamoxifena, kao antiestrogene supstance pokazala se kao efikasna u tretmanu nekih kuja sa mamarnim adenokarcinomima.

Klinički pokušaji imunoterapije tumora mlečne žlezde kuja su još uvek eksperimentalni. Kao nespecifični imunostimulansi, najčešće se koriste levamizol, *Corynebacterium parvum* i BCG. Stimulacija imunog sistema nakon hirurškog odstranjivanja tumora može produžiti vreme preživljavanja pacijenta i smanjiti mogućnost pojave recidiva tumora.

Literatura:

1. *Ferguson HR* : Canine Mammary gland tumors, Vet Clin North American Small animal Pract, (1985)
2. *Kitchell BE*: Mammary tumors; in. Bonagura JD editor, Philadelphia, 1098-1103 (1995)
3. *MacEwen GE. And Withrow SJ*: Tumors of the mammary gland in clinical veterinary oncology. Philadelphia. JB. Lippincot, 292-304, (1989)
4. *Vladimir Magaš*: Magistarski rad: Procena maligniteta tumora mlečne žlezde kuja (2002)
5. *Mann FA*; Canine mammary gland neoplasia: Canine Practice, vol 11, No 4,(1984)
6. *Henry CJ, Pope ER*. Methods of tumor diagnosis: fine-needle aspiration and biopsy techniques 2010
7. *Gillian M. Simpson GE; Gary c.w.* England SE;BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology
8. *Susan North; Tania Banks*;Introduction to Small Animal Oncology(2009)
9. *Riser WH*: Surgical removal of the mammary gland of the bitch. JAVMA
10. *Midsorp W.:* Else RW., Helmen E., Lipscomb TP,: Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Second series. Vol. 7; Wasington DC, (1999)
11. *Knežević M., Jovanović M.:* Opšta patologija, Beograd (1999)
12. *Ettinger SJ*: Textbook of veterinary internal medicine: Disease of the dog and cat. WB Sanders 3th edition,(1989)
13. *Theresa W. Fossum*; Small Animal Surgery; 2th edition,(2002)

**PROCENA CITOLOŠKOG I MIKROBIOLOŠKOG KVALITETA DUBOKO
ZAMRZNUTOG SEMENA BIKA**

***EVALUATION OF QUALITY CYTOLOGY AND
MICROBIOLOGY BULL SEMEN***

Vakanjac Slobodanka, Pavlović Vojislav, Pavlović Miloš, Nedić Svetlana

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Kratak sadržaj

Za proizvodnju i distribuciju kvalitetnog semena u programu za veštačko osemenjavanje koriste se samo bikovi koji su prošli odgovarajuće testiranje, slobodni od bolesti, i njihovo seme se prikuplja i obrađuje u skladu sa standardnim protokolima. Prema standardima za proizvodnju duboko zamrznutog semena bikova, koncentracija spermatozoida u ejakulatu uzoraka izabranih za zamrzavanje ne sme da bude manja od 500 miliona/ml, minimalna progresivna pokretljivost 70%, a krajnje razblaženje mora sadržavati minimum 20 miliona spermatozoida po dozi. Nakon otapanja – minimalna koncentracija spermatozoida po dozi trebala bi da bude 20 miliona, a progresivna pokretljivost mora biti minimum 50%. Uzorci semena se ne upotrebljavaju ukoliko sadrže više od 20% patološki promenjenih spermatozoida.

U tehnološkom procesu obrade semena u razređivače se dodaju antibiotici širokog spektra (Penicilina i Streptomicina), ili kombinacija Gentamicina, Tilozina i Linkospektina koja uspešno kontroliše mikoplazmu. Ipak, neki mikroorganizmi prežive obradu i niske temperature skladištenja. Duboko zamrznuto seme trebalo bi da bude slobodno od patogenih, i od uslovno patogenih mikroorganizama. Cilj mikrobioloških analiza je identifikacija patogenih, kao i određivanje broja saprofitskih mikroorganizama koji mogu, kada je njihov broj veći od dozvoljenog da kontaminiraju seme i učine ga neupotrebljivim. Prema preporukama OIE ukupan broj saprofitskih mikroorganizama u semenu ne bi trebao da prelazi 5000 cfu/ml (Appendix 3.2.1., Article 3.2.1.6).

Ključne reči: zamrznuto seme bika, progresivna pokretljivost, mikroorganizmi u semenu.

Summary

For the production and distribution of quality bull semen in artificial insemination are used only bulls that have passed the relevant tests, free from

disease, and their semen are collected and processed in accordance with standard protocols. According to the standards for the production of bovine frozen semen, sperm concentration in semen samples selected for freezing should not be less than 500 million / ml, minimal progressive motility 70%, and final dilution must contain at least 20 million sperm per dose. After thawing - the minimum concentration spermatzoa per dose should be 20 million, and the progressive movement must be at least 50%. The semen samples are not used if they contain more than 20% of pathologically altered sperm. The technological process of processing semen in diluents are added to broad-spectrum antibiotics (Penicillin and Streptomycin), or a combination of Gentamicin, Tylosin and Lincospectin that successfully controls the Mycoplasma. However, some organisms survive processing and low temperature storage. Frozen semen should be free of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms. The goal of the analysis is the identification of microbial pathogens, and specify the number of saprophytic microorganisms that may, if their number is larger than that make semen unusable. According to the recommendations of the OIE total number of saprophytic microorganisms in the seed should not exceed 5000 cfu / ml (Appendix 3.2.1., Article 3.2.1.6).

Key words: *frozen bull semen, progressive motility, microorganisms in the semen.*

Spermatozoidi predstavljaju visoko diferencirane ćelije koje se stvaraju u semenim kanalićima od puberteta do senilnog perioda, lageruju se u epididimisu odakle bivaju izbačeni prilikom ejakulacije. Sposobnost progresivnog (pravolinijskog) kretanja kroz sredine različite viskoznosti (seminalne tečnosti i ženskog reproduktivnog trakta) i njihova morfologija u najvećoj meri određuju fertilizacionu sposobnost sperme.

Sušтина konzerviranja sperme koja će se koristiti za veštačko osemenjavanje sastoji se u sprečavanju metaboličkih procesa u spermatozoidima primenom niskih temperature. Postupnim delovanjem niskih temperature sperma se prevodi u stanje fiziološke anabioze (vita minima) gde se metabolički procesi i pokretljivost smanjuju na najniži mogući nivo. U tom neaktivnom stanju spermatozoidi se ne kreću, ne trpe degeneracione promene, a zadržavaju energiju i sposobnost oplodjenja. Osnovna metoda konzerviranja sperme bikova je zamrzavanje na temperature tečnog azota -196°C. Ovo stanje je reverzibilno, i zagrevanjem spermatozoidi ponovo postaju pokretni i sposobni za oplodnju.

Prilikom zamrzavanja i odmrzavanja semena neminovno dolazi do oštećenja jednog dela spermatozoida usled stvaranje unutarćelijskih kristala leda, osmotskog šoka, i toksičnosti krioprotektora. Promene temperature i osmolarnosti mogu dovesti do oštećenja plazma membrane, akrozomalnih membrana i poremećaja funkcije mitohondrija spermatozoida u zamrznutom semenu. Prema Miljković (1998) prilikom zamrzavanja i odmrzavanja dolazi do

oštećenja 2-20% spermatozoida. Mehanička oštećenja spermatozoida kao posledica stvaranja intracelularnog leda su jače izražena prilikom sporog odmrzavanja, te stoga ubacivanje duboko zamrznutog semena u sredstvo za otapanje (topla voda) mora biti brzo, da bi se što više izbegla rekristalizacija i oštećenja ćelijske membrane. Spermatozoidi su posebno opterećeni kritičnim temperaturama -10 do -60°C, i to prilikom i zamrzavanja i odmrzavanja semena. U ovoj temperaturnoj zoni neminovno su izloženi destruktivnom delovanju fenomena kristalizacije i rekristalizacije, zbog čega jedan deo spermatozoida propada.

Svrha laboratorijskog pregleda semena je procena da li je pogodano za razređivanje, duboko zamrzavanje, odnosno veštačko osemenjavanje.

Laboratorijske metode pregleda duboko zamrznutog semena bika

Ocena pokretljivosti spermatozoida

- Mikroskopski pregled
- Kompjuterski analizatori (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis)

Određivanje koncentracije spermatozoida

- Hemocitometar
- Kompjuterski analizator (CASA) ili protočni citometar

Procena morfologije spermatozoida

- Ocena integriteta ćelijske membrane (Bojenje po Bloomu)
- Ocena stanja akrozoma spermatozoida (bojenje po Farelly-u ili modifikovano bojenje po Karas-u)
- Protočna citometrija

Mikrobiološki pregled uzoraka duboko zamrznutog semena

Ocena pokretljivosti spermatozoida

Za procenu kvaliteta i oplodne sposobnosti semena osnovni kriterijum je procenat progresivno pokretljivih spermatozoida. Smatra se da samo progresivno pokretni, aktivirani i hiperaktivni spermatozoidi mogu doći u priliku da oplode jajnu ćeliju. Spermatozoidi bika se kreću pravolinijski, progresivno u pravoj liniji i oko podužne osovine. Kretanje unapred obezbeđuje kinetički aparat u telu i repu, dok je kretanje oko uzdužne osovine rezultat asimetrične građe glave spermatozoida. Patološki oblici kretanja (kružno, vijugavo, u mestu) su predznak skore smrti spermatozoida i ne ulaze u procenu pokretljivosti.

Prema standardima za proizvodnju duboko zamrznutog semena bikova, uzorci semena koji se odabiraju za zamrzavanje moraju imati minimum 70% progresivno pokretljivih spermatozoida. Nakon otapanja minimalna prihvatljiva progresivna pokretljivost je 50%.

Mikroskopski pregled je najvažnija kontrola kvaliteta semena. Ocena progresivne pokretljivosti spermatozoida vrši se mikroskopskim posmatranjem višeće kapi. Iako subjektivna, ova metoda je nezamenjiva i pri dobroj uvežbanosti daje zadovoljavajuće rezultate.

Za određivanje procenta pokretljivih spermatozoida i kvantifikaciju kvaliteta njihove pokretljivosti sve više je u upotrebi kompjuterski asistirana analiza sperme (CASA) sistem koji

uz pomoć specijalnog softvera daje jasnu sliku o vrednostima nekoliko parametara brzine: procenata ukupne pokretljivosti (TM%), linearne pokretljivosti spermatozoida (progresivna pokretljivost – ubrzanje PM%*), prosečne brzine puta (VAP mikromet/s), brzine pravolinijskog kretanja (VSL mikromet/s), brzine krivolinijskog kretanja (VCL mikromet/s).

Mikroskopskim pregledom (metod stisnute kapi) 00 uzoraka duboko zamrznutog semena bika dostavljenih u Laboratoriju za mikrobiologiju i citologiju Katedre za porodiljstvo, sterilitet i V.O., u vremenskom periodu od 4 godine, utvrđeno je da u najvećem broju uzoraka (76%, 303 uzorka) nakon otapanja progresivna pokretljivost spermatozoida između 55%-60%. Na granici prihvatljivosti upotrebe za V.O, odnosno sa progresivnom pokretljivošću od 50% bio je samo jedan uzorak (0,25%), dok je u 24% uzoraka progresivna pokretljivost spermatozoida bila u intervalu od 65% do 75%.

Određivanje koncentracije spermatozoida

Veoma važan kriterijum za procenu kvaliteta i fertilne sposobnosti semena je i koncentracija spermatozoida. Na osnovu koncentracije spermatozoida određuje se stepen razređenja ejakulata i broj doza za osemenjavanje.

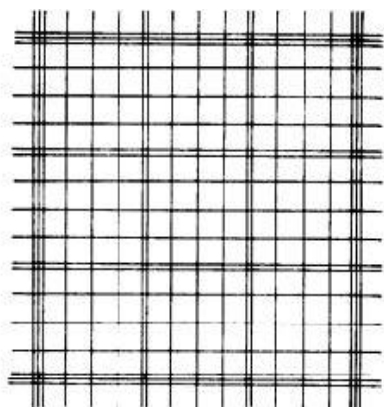
Prema standardima za proizvodnju duboko zamrznutog semena bika uzorci nativnog semena kod kojih je koncentracija spermatozoida manja od 500 miliona po jednom ml ejakulata se odbacuju, dok finalno razblaženje semena mora da sadrži minimum 20 miliona spermatozoida po dozi.

Za određivanje broja spermatozoida u semenu može se upotrebiti hemocitometar-komorica za brojanje eritrocita (Bürker-Türk). Uz komoricu su potrebni eritrocitni melanžer, staklena ljuspica i 3% hipertonični rastvor NaCl.

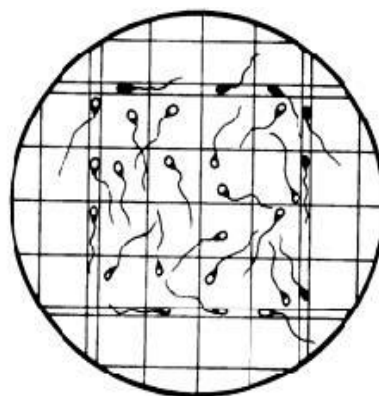
Postupak brojanja: Pod mikroskop se postavi hemocitometer i na malom uvećanju se pronađe mrežica (komorica) za brojanje. U eritrocitni melanžer se uvuče sperma do oznake 0,5, a 3% NaCl do oznake 101. Tako se, u melanžeru, napravi razređenje sperme u odnosu 1:200.

Palcem i srednjim prstom se zatvore krajevi melanžera i promućka se nekoliko puta. Prva kap, iz kapilare melanžera se ispusti, a ostatak se ubaci između pokrovne pločice i stakla hemocitometra. Objektiv mikroskopa se podesi na srednje uvećanje i broje se spermatozoidi, koji se nalaze u 5 srednjih (80

malih) kvadratića mrežice (Slika 1). Pri brojanju uzimaju se samo oni spermatozoidi čije se glave nalaze unutar kvadratića (Slika 2).



Slika 1.



Slika 2.

Formula za izračunavanje koncentracije spermatozoida je:

$$C = n \times r \times 50.000$$

- **C** – ukupan broj spermatozoida u 1ml native sperme
- **n** – broj spermatozoida izbrojan u 5 velikih kvadrata mrežice hemocitometra
- **r** – stepen razređenja, napravljen u melanžeru
- **50.000** – koeficijent komorice za brojanje

Metodom hemocitometrije se broje spermatozoidi u malom uzorku duboko zamrznutog semena, a zatim se izračunavanjem dobija broj spermatozoida u 1ml duboko zamrznutog semena, odnosno u celokupnom ispitivanom uzorku.

U zemljama Evropske unije, a i kod nas, u upotrebi su mini pajete (0,25ml) koje bi trebalo da sadrže dovoljan broj živih spermatozoida potrebnih za oplodnju (10-20 miliona).

Od 400 uzoraka dostavljenih u Laboratoriju, zahtev za određivanjem koncentracije spermatozoida u 1ml duboko zamrznutog semena bika dobijen je za 83 uzorka. Metodom hemocitometrije koncentracija spermatozoida u intervalu 10,5-15,5 miliona/ml semena je ustanovljena kod 21 uzorka (25,3%), 15,6-20,5 miliona/ml kod 16 uzoraka (19,3%), 20,6-25,5 miliona/ml kod 21 uzorka (25,3%), 25,6-30,5 miliona/ml kod 17 uzoraka (20,5%), dok je u najmanjem broju uzoraka (8 uzoraka, odnosno 9,6%) ustanovljena koncentracija spermatozoida preko 30 miliona/ml (30,6-35,5 miliona/ml).

Procenjivanje morfologije spermatozoida

Za određivanje celovitosti membrane spermatozoida, odnosno određivanje da li su pre pravljenja preparata spermatozoidi bili živi ili mrtvi najviše primenjivan metod bojenja je vitalno ili diferencijalno-dijagnostičko bojenje **eozinom-nigrozinom** po **Blomu**. Čelijska membrana spermatozoida koji su bili mrtvi pre početka pravljenja preparata propušta u citoplazmu crvenu boju-eozin, pa se njihove glave oboje crveno. Čelijske membrane živih spermatozoida su selektivno propustljive i ne propuštaju velike molekule eozina - zbog toga su njihove glave, pod mikroskopom bele.

Za ocenu funkcionalnog integriteta čelijske membrane može se koristiti i HOS test ili hipoosmotsko bubrenje.

Uporedo sa određivanjem broja živih i mrtvih spermatozoida u preparatima obojenim po Blomu, možemo ustanoviti i patološke oblike spermatozoida, kao i procenat spermatozoida sa protoplazmatičnom kapljicom. Patološki oblici spermatozoida mogu biti primarni – nastaju za vreme spermatogeneze (gigantski spermatozoidi, mikrospermatozoidi, višeglavi spermatozoidi, spermatozoidi sa promenama na repu, defekti glave i vrata spermatozoida,), i sekundarni koji nastaju u pasemicima ili kasnije (otpale glave, proksimalna i distalna protoplazmatična kapljica, savijeni repovi, otpali akrozomi). Proksimalna ili distalna protoplazmatična kapljica predstavlja rezidue protoplazme i lipoproteina, a ovakve, nezrele forme spermatozoida su slabo otporne i neplodne.

Iako prema nekim autorima (Cergelj i Samardžija, 2006) ova metoda nije pogodna za ocenu vitalnosti spermatozoida nakon zamrzavanja/odmrzavanja semena zbog prisustva glicerola koji interferira sa bojama, bojenje po Blomu dostavljenih uzoraka dalo je sasvim zadovoljavajuće rezultate, i ustanovljeno je da broj mrtvih spermatozoida nakon odmrzavanja semena obično iznosi 25-45%.

Treba napomenuti da prema standardima za proizvodnju duboko zamrznutog semena bikova ejakulati u kojima se ustanovi procenat patološki promenjenih spermatozoida veći od 20% se odbacuju. Iskustva naše Katedre pokazuju da se u uzorcima duboko zamrznutog semena bika nakon odmrzavanja procenat patološki izmenjenih spermatozoida kreće od 15-20%, od čega je najveći procenat spermatozoida bez repa 1-6%, 2-3% spermatozoida sa malom glavom, 3-5% bez glave, savijeni repovi 2-4%.

Morfološko ispitivanje akrozoma spermatozoida

Građa spermatozoida je prilagođena osnovnoj funkciji, oplodnji jajne ćelije. Glava spermatozoida predstavlja jezgro ćelije sa okolnom protoplazmom i hromatinskim materijalom. Na njenom vrhu se uočava *akrozom*, koji ima značajnu ulogu u oplodnjenju jer oslobađa enzim hijaluronidazu koja otapa omotače jajne ćelije in a taj način omogućava da u nju prodre spermatozoid. Različiti defekti akrozoma rezultiraju i slabijim rezultatima osemenjavanja.

Tokom procesa zamrzavanja dolazi do oštećenja akrozoma određenog broja spermatozoida, te je neophodno morfološko ispitivanje nakon zamrzavanja/odmrzavanja. Utvrđivanje odnosa intaktnih i oštećenih akrozoma moguće je pregledom preparata obojenih po **Karrasu** (metahrom, viktorija-plavo), ili po **Brendan T. Farelly-u** (anilinplavo, kristalviolet).

Analiza integriteta membrane akrozoma moguća je i protočnom citometrijom. Bojenjem po Karassu, i pažljivim pregledom preparata utvrđeno je da se u uzorcima procenat spermatozoida sa oštećenjem akrozoma obično kreće od 3% do 7%.

Mikrobiološki pregled semena

Za proizvodnju i distribuciju kvalitetnog semena u programu za veštačko osemenjavanje koriste se samo bikovi koji su prošli odgovarajuće testiranje, slobodni od bolesti, i njihovo seme se prikuplja i obrađuje u skladu sa standardnim protokolima. Ipak, mikroorganizmi su u manjem ili većem procentu prisutni u svakom ejakulatu. Mikrobiološki pregled semena je neophodan, kako bi na vreme prevenirali razna patološka stanja: rana embrionalna uginuća, abortusi, endometritisi, zaostala posteljica i produžen međutelidbeni period, a koja mogu nastati kao posledica unosa mikrobiološki neispravnog semena u genitalni trakt ženke prilikom osemenjavanja. Prisustvo mikroorganizama u semenu može dovesti do smanjenja broja i pokretljivosti spermatozoida, a procenat patološki promenjenih spermatozoida uglavnom je povećan (Khalili i sar., 2000).

Prema Zakonu o veterinarstvu Republike Srbije, članu 115 (Promet reproduktivnog materijala) "zabranjen je promet, uvoz ili izvoz semena za veštačko osemenjavanje, jajnih ćelija i oplodjenih jajnih ćelija koji sadrži uzročnike bolesti životinja ili veći broj bakterija od dozvoljenog ili koji svojim biohemijskim, biofizičkim i morfološkim svojstvima ne ispunjavaju uslove za reprodukciju".

Poznato je od ranije da krioprezervacija može smanjiti koncentraciju bakterijskih kontaminenata u spermi bika (Mazurova i sar., 1975). Ipak, mnogi sastojci razređivača semena mogu delovati kao stabilizatori za m.o. na niskim temperaturama (npr. mleko, glicerol, serum ili serumski albumin, saharoza, sorbitol i drugi šećeri) (Bielanski i Vajta, 2009). Garcia i sar. (1981) navode da su mikroorganizmi (β -hemolitične streptokoke, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*) izolovani iz svežeg ejakulata, bez značajnijeg smanjenja u broju izolovani i nakon zamrzavanja uzoraka u tečnom azotu.

Prema literaturnim podacima iz uzoraka duboko zamrznutog semena najčešće se izoluju ubikvitarni mikroorganizmi spoljašnje sredine, i oportunistički patogeni niskog značaja za izazivanje bolesti kod ljudi i životinja. Međutim, čak i ta mikroflora može dovesti do infekcije, prema OIE (Appendix 3.2.1.) koji definiše da „unošenje većeg broja ili određene kombinacije egzogene

mikroflora, može da oslabi imunološki odbrambeni sistem, što može dovesti do infektivnih procesa“.

Cilj mikrobioloških analiza je identifikacija patogenih, kao i određivanje broja saprofitičkih mikroorganizama koji mogu, kada je njihov broj veći od dozvoljenog da kontaminiraju seme i učine ga neupotrebljivim. Prema preporukama OIE ukupan broj saprofitičkih mikroorganizama u semenu ne bi trebao da prelazi 5000 cfu/ml (Appendix 3.2.1., Article 3.2.1.6)

Pojedini mikroorganizmi koji se izoluju iz duboko zamrznutog semena, preživljavaju na -196°C u tečnom azotu, i stiču određeni stepen rezistencije na antibiotike (Ronald i Probhakar, 2001), koji se putem razređivača čiji je sadržaj regulisan Direktivom Evropske Unije 2003/43/CE dodaju u seme.

Rezultati ispitivanja 400 uzoraka duboko zamrznutog semena bika dostavljenih u Laboratoriju pokazuju da je u 9 uzoraka izolovan *Citrobacter freundii* u čistoj kulturi, *Pseudomonas stutzeri* u 7, a *Candida albicans* u 5 uzoraka. Infekcije krava sa ***Candida albicans*** su opisane u literaturi, i poznato je da mogu da dovedu do smanjena fertiliteta, abortusa (Quinn i sar., 2002), endometritisa (Wang i sar., 2011), i mastitisa (De Casia Dos Santos i Marin, 2005; Seker, 2010; Quinn i sar., 2002).

Pseudomonas stutzeri je vrlo raširen u prirodi, i uopšteno se smatra uzročnikom oportunističkih infekcija, i svoju patogenost ispoljava u organizmu oslabljenog imuniteta.

Citrobacter freundii je poznat kao oportunistički patogen ljudi i životinja, koji se često nalazi u vodi, zemljištu i otpacima. U literaturi su ranijih godina opisani mastitisi (McDonald i sar., 1970), abortusi (Renken-Zurne, 1985) i dijareje goveda (Kabankov i Kvasnikova, 1980) izazvane sa *Citrobacter spp.*, dok su podaci o patogenom delovanju vrste *Ctr. freundii* na reproduktivno zdravlje krava oskudni.

Mikrobiološki nadzor nad kvalitetom semena bi trebao da spreči širenje potencijalno patogenih mikroorganizama, a imajući u vidu potencijalni patogeni efekat izolovanih mikroorganizama iz duboko zamrznutog semena, mišljenja smo da je seme bikova iz koga su izolovani *C. albicans*, *Pseudomonas stutzeri* i *Ctr. freundii* neupotrebljivo za veštačko osemenjavanje krava.

Literatura:

1. Bielanski A, Vajta G, 2009, Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units, *Human Reprod*, 24, 2457-2467
2. Cergelj M, Samardžija M, 2006, Veterinarska andrologija
3. De Casia Dos Santos R, Marin JM, 2005, Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil, *Mycopathologia*, 159(2), 251-253

4. Garcia A, Sierra MF, Friberg J. Survival of bacteria after freezing of human semen in liquid nitrogen. *Fertil Steril* 1981;35:549-551
5. Kabankov JS, Kvasnikova ED, 1980, Bakteriologische Untersuchungen beim Ferkeldurchfall, *Veterinarija Moskva* 7, 32-34
6. Khalili MA, Pourshafie MR, Saifi M, Khalili MB, 2000, Bacterial infection of the reproductive tract of infertile men in Iran, *MEFSJ*, 5, 126-131
7. Mazurowa J, Rysanek M, Forejtek M, 1975, Effect of long-term freezing preservation on the level of bacterial contamination of the sperm, *Vet Med (Praha)*, 20, 147-152
8. McDonald TJ, McDonald JS, Rose DL, 1970, Aerobe gram-negative rods isolated from bovine udder infections, *Am J Vet Res*, 31, 1937-1941
9. Miljković V, 1998, Veštačko osemenjavanje životinja
10. Office International Des Epizooties, 2003, Appendix 3. 2. 1., Bovine semen. Article 3.2.1.6. General considerations for hygienic collection and handling of semen, *Terrestrial Animal Health Code. Twelfth Edition*, 335-6
11. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, 2002, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* Ronald BSM, Prabhakar TG, 2001, Bacterial analysis of semen and their antibiogram, *Ind J Anim Sciences*, 71(9), 829-831.
12. Renken-Zurne A, 1985, Vorkommen und veterinärmedizinische Bedeutung von Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae mit Ausnahme der Gattungen Escherichia und Salmonella sowie der Spezies Yersinia pestis, *Vet. Med, Diss Hannover*
13. Ronald BSM, Prabhakar TG, 2001, Bacterial analysis of semen and their antibiogram, *Ind J Anim Sciences*, 71(9), 829-831.
14. Seker E, 2010, Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey, *Mycopathologia*;169(4), 303-308
15. Wang JT, Chang SC, Chen YC, Luh KT, 2000, Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods, *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 33(4), 258-62

EGZOGENI UZROCI STERILITETA KOBILA

EXOGEN CAUSES OF INFERTILITY IN MARES

Miloš Pavlović, Slobodanka Vakanjac, Svetlana Nedić

Fakultet veterinarske medicine Beograd

Kratak sadržaj

Kobile su važna životinjska vrsta čiji graviditet traje oko jedne godine, pa nas jedno ždrebe godišnjemože učiniti srećnim. Generalno njihova uspešnost u plodnosti je niska. Ukoliko izgubimo i to jedno ždrebe, onda nastaje značajan finansijski gubitak i za odgajivača i za vlasnika. Reproductivno zdravlje priplodne kobile u ovom slučaju je od izuzetne važnosti. Kobila nije ni auto koji se parkira i po koji ćete doi za godinu dve ili tri. Ona zahteva pažnju svaki dan. Uspešnost prvog pripusta jeosnovdobrogmenadžmenta. Ukoliko ste se odlučili da se bavite priplodom konja umestonečim drugim kaoštoje jedrenje s vremena na vremeonda učinite sve od sebe da osigurate dobar priplodni status i reproductivno zdravlje. Rezultat će biti kao vaša lična beba ali u ovom slučaju mnogo energičnija od prvog dana života.

Na žalost uvek se desi nešto drugo pa uzroci steriliteta kao i priroda nas odvedu negde drugde. Veoma kratka sezona sa mnogo razloga da kobila ne "zakači" reproductivnu šansu su uvek protiv odgajivača ali i veterinaru. Postojeći problemi sa plodnošću predstavljaju opasnost kod kobilaukoliko potraju. Svaki povratak u dalju reproductciju je težak rad veterinarskog rada sa velikimuspehom. Ko god je spreman da uvede ovo "hodanje tamnom stranom meseca" na svakom koraku može da očekuje iznenađenja. Zato hajde da prošetamo zajedno.

Ključne reči: egzogeni, sterilitet, kobile.

Summary

Mares as important domestic species with almost one year gestation, make us happy with single offspring per year. Generally the fertility rate is low. Loosing of a foal is wasting of significant money for any owner or breeder. Broodmare health in this case is on of the most important point. It is not a car, can park and come back in one, two or three years to pick it up. You must attend her every single day. First service make successful is important for good management. If you're decided to be in horse breeding rather than something easier , like to sail from time to time

than do everything you can ensure good breeding health, and result. That result will be like your own baby but this time very energetic from his first day of life.

Unfortunately, always happened something else and causes of infertility are enormous and nature can avoid by its own way. Very short season and many reasons not to catch a reproduction chance are always against breeder and often a vet. Existing fertility problems are danger in mares as take a longer time. So every return in fertility after period of a hard veterinary work is great success. Whoever is interesting to introduce such walk of this dark side of the moon in every step can expect surprise. So, let's take a walk together.

Key words: *exogen, infertility, mares.*

Sterilitet kobilica predstavlja nemogućnost oplodnje, koncepcije i donošenje na svet živog ždrebeta. Razlozi za nastanak steriliteta su brojni ali je važna njihova sistematizacija kako bi se našlo rešenje kojim se problem prepoznaje, dijagnostikuje, prati, određuje prognoza i adekvatnim tretmanima pokuša prevođenje u plodnost. Sterilitet kobilica se procenjuje i kategorizuje kako bi se mogao istražiti svaki aspekt njegovog nastanka.

Sterilitet se javlja na više načina i u različitim periodima pa se može podeliti prema manifestacijama na:

- *kobile koje ne pokazuju polni ciklus,*
- *kobile koje imaju manifestan polni ciklus ali ne koncipiraju ili dođe do embrionalnog uginuća do 35. dana*
- *kobile koje imaju manifestan polni ciklus, koncipiraju ali posle 35. dana dolazi do abortusa ili reapsorpcije fetusa*

Brojni su razlozi za nastanak steriliteta kobilica posebno što na nastanak ovog značajnog problema mogu uticati brojni uzročnici endogenog i egzogenog tipa.

Egzogeni uzročnici steriliteta kod kobilica su:

- | | |
|-----------------|-----------------------|
| - Nutritivni. | - Klimatski |
| - Infektivni | - Sezonski |
| - Toksini | - Stresni |
| - Razni lekovi | - Tehničko-tehnološki |
| - Zoohigijenski | |

Kobile koje uopšte ne pokazuju polni ciklus često zauvek ostaju van reprodukcije. Kod drugog broja kobilica razlog za izostanak estrusa je sezonalnost i uticaj fotoperioda na jajnički ciklus pa se u zimskim mesecima javlja anestrus. Ovaj period se naziva i tranzicioni a praćen je prolongiranim diestrusom i

pojavom neovulatornih folikula koji nisu veći od 1-1,5 cm i privremenom regresijom jajničkog tkiva. Izvestan broj kobila pokazuje neregularan ciklus i tokom sezone parenja ali ostaju bez koncepcije i odbijaju pastuve zbog prisustva nedominantnih malih neovulatornih folikula na jajnicima. Ostali razlozi za potpuni izostanak polnog ciklusa mogu biti tumori jajnika ili hromozomske anomalije. Kariotipske aberacije se mnogo češće javljaju kod kobila nego što se to i dijagnostikuje. Spoljni izgled genitalnog trakta i fenotipske odlike odgovaraju kobilama ali se rektalnom palpacijom otkrivaju manji jajnici nego obično. Materica i cerviks znatno manji mada se spekulomom ne otkriva razlika. Seksualno ponašanje ovih životinja je pasivno ili su ciklusi neregularni. Prolongirani diestrus nastaje zbog perzistencije CL ili lažnog graviditeta izazvanog različitim faktorima .

Produžena lutealna faza nastaje:

- zbog neregularnosti u lučenju PGF,
- ranog embrionalnog uginuća različitog porekla.

Prisustvo uginulog embriona može izazvati edem vimena, obično unilateralno ili bilateralno, pa se ovakvoj kobili, koja nije pregledana ultrazvukom pripisuje graviditet (u ovom slučaju lažan). Razlog za poremećaj u lučenju PGF se može tražiti i embrionalnom uginuću posle prepoznavanja zametka od strane majke. Kobile koje se ne pregledaju ne ulaze u novi estrus i ovaj period može potrajati i do 90 dana.

Rano embrionalno uginuće predstavlja uginuće pre završene organogeneze. Nizak nivo progesterona ne mora da ukazuje na rano embrionalno uginuće. Takođe i prisustvo ECG *equine chorio gonadotropnog hormona*, ne ukazuje na embrionalno uginuće ukoliko su embrionalne čašice formirane. Palpacija nije uvek dovoljna metoda da bi se utvrdilo da li je embrion živ ili ne. Svako potcenjivanje situacije i pretpostavka o graviditetu lako zanemari ozbiljnost koju nosi gubitak embriona. Mogućnost primene rane ultrazvučne dijagnostike (14-16. dana) je relevantan dokaz embrionalnog uginuća.

Brojni su razlozi koji izazivaju rano embrionalno uginuće

Različita patološka stanja su jedan od osnovnih uslova gubitka embriona. Fibrozne promene u materici i cerviksu kao posledice mehaničkih povreda ili oštećenja nastala prethodnim porođajem, parenjem ili tretmanom a koja su uticala na nastanak parenhimskih mostova kao i posledične promene u sekretornoj aktivnosti materičnih žlezda zbog odvajanja placente. Deficit progesterona može imati uticaj na gubitak embriona za razliku od primarne lutealne insuficijencije. Sekundarna lutealna insuficijencija može da ima potencijalni uticaj na lučenje endogenog prostaglandina što zajedno sa egzogenim progestagenima može izazvati rizik ždrebnosti. Postoji uzajamna vezanost između ranog embrionalnog uginuća i progesterona jer pad

progesterona može značiti i gubitak ploda a tada je neminovno da se nastavi dalji pad ovog hormona. Pojedinačna merenja sa vrednošću progesterona u ranom graviditetu < 2 ng nije indikativno da bi se govorilo o njegovom deficitu. Ukoliko bi ova vrednost bila zabeležena u dva uzastopna dana, tek tada govorimo o deficitu progesterona. Do sad primena egzogenih P4 nije pokazala sporedan efekat na ždrebnost kod kobila. Takođe treba napomenuti da nadoknada progesterona nije imala uticaj na povećanje redovnosti graviditeta kobila. Sprečavanje nastanka sterilitetakođ kobila kod kojih je došlo do koncepcije može se vršiti primenom progestinske terapije u prvih 105-120 dana gestacije.

Progesteronska podrška rizične ždrebnosti

- Progesteron uljani rastvor u koncentraciji od 150 mg u prvih 10-14 dana a zatim dnevna administracija od 200 mg svaki drugi dan
- Repositol progesteron u dozi od 1000 mg svaki 4. dan
- BioRealise P4 LA 150 (BET Pharm-1500 mg. i/m svakih 7 dana
- Altrenogest (Regu-Mate) perorlni progestin -1ml/50 kg

Primena progestinske terapije u održavanja konceptusa i trudnoće mora biti periodično proverena obzirom da primena ovih preparata ne mora uvek da da dovoljan terapeutski efekat.

Ukoliko do 50. dana gestacije dođe do luteolize indikativno je embrionalno uginuće a posle 120. dana čak ni ovariektomija nema uticaj na eventualni gubitak fetusa. Na gubitak ždrebnosti utiče i poremećaj u lučenju ili administracija PGF koji dolazi ekstra-uterino a izazvaće luteolizu i gubitak ždrebnosti. Prestanak graviditeta ne nastaje neposredno posle luteolize i obzirom da postoji mogućnost održavanja graviditeta nadoknadom progestina. Primena P4 ili altrenogesta može u mnogim situacijama da održi graviditet.

Endometritisi kao uzročnici steriliteta kobila se mogu posmatrati na sledeći način:

- Endometritisi kao posledica polno prenosivih bolesti
- Hronično prisutne infekcije endometrijuma
- Hronično degenerativne promene uterusa-endometriosa ili periglandularna fibroza koja ima značajan uticaj na porast ranog embrionalnog uginuća

Infektivni uzročnici steriliteta

Polno prenosivi endometritisi kao egzogeni uzročnici steriliteta kobila se najčešće pojavljuju u formi CEM (Contagious Equine Metritis). Ovu bolest najčešće izaziva Tylorella equigenitalis, gram negativna bakterija, koja ima spor rast na 5% CO₂ agaru. Uspešno preživljava na spoljnim delovima genitalija pastuva koji ne mora da pokazuje znakove infekcije ali je stalni kliconoša i prenosilac infekcije. Kod oplodjenih kobila ovaj mikroorganizam perzistira na

klitorisu vagine kobile, odnosno u centralnom sinusu klitorisa. Inficirane kobile pokazuju znake akutnog endometritisa sa prisutnim gusto sivim mukoidnim iscetkom koji se pojavljuje kao vidljiv uvek posle parenje i obično utiče na skraćenje ciklusa, obzirom na inflamatorni proces koji izaziva. Znaci akutnog procesa vrlo brzo nestaju i bolest postaje asimptomatska. Ova bolest je kao uzročnik steriliteta kobila uključena u nacionalne programe dijagnostikovanja, suzbijanja i iskorenjivanja u mnogim zemljama. Prisustvo ovog oboljenja kod kobila se ispituje u dijagnostičke svrhe u zavisnosti od stepena infekcije i to:

- *Akutni oblik* na osnovu cervikalnog ili brisa iz uterusa,
- *Hronični oblik* se dijagnostikuje na osnovu brisa iz centralnog sinusa klitorisa kod kobila a kod pastuva se bris uzima iz fosse urethralis, takođe iz uretre, pre-ejakulacione frakcije, prepucijuma ili sa kože penisa. Životinja je negativna na infekciju samo u slučaju ponovnog negativnog nalaza a transport uzoraka mora biti obavljen uz prisustvo posebnog medijuma.

Ovu bolest karakteriše pojačan rast antitela u periodu od 7-45 dana od infekcije.

Tretman pastuva podrazumeva primenu chlorhexidina koji se aplikuje na kožu i sluzokožu prepucijuma ali se koristi i nitrofurazon. Kod kobila tretman često mora da bude ponovljen i zasniva se na intra uterinoj primeni antibiotika kao i tretmanu fose klitorisa takođe chlorhexidinom ili nitrofurazonom. Pojedine zemlje u zavisnosti od zahteva uvoznika eksportuju kobile kojima je osim medikamentoznog tretmana urađena i hiruška ablazija fose i sinusa klitorisa

Polno prenosive bolesti kao egzogeni uzročnici steriliteta kobila su i bolesti kao što su

- Pseudomona i Klebsiela
- Durina koju izaziva Trypanosoma equiperdum
- EHV3 (Equine coitale exanthema) koju izaziva herpesvirus, koji izaziva veoma bolne lezije na vulvi, penisu i prepucijumu.
- Hronični endometritisi

Najčešće nastaju kao posledica *kontaminacije uterusa ili upornih parenja* kombinovanog sa unošenjem infekcije koja se naseljava na onim mestima u uterusu gde postoje inzulti na endometrijum nastali na ovaj način. Iako kao uslovna barijera unošenja i nastanka hroničnih infekcija postoje vulva, vaginalno-vestibularni sfinkter i cerviks, ovo nije dovoljna prepreka za brojne mikroorganizme. Najčešći uzročnici hroničnih infekcija endometrijuma kod kobila su: E Colli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiela pneumonia i gljivice. Od ostalih uzročnika hroničnih infekcija endometrijuma sa značajnim porastom su: Proteus sp., Corynebacterium sp., Staphylococcus, Shigela. Kod gljivičnih infekcija materice najčešći su kao uzročnici izoluju Candida albicans, Aspergillus sp., Mucor sp. Hronični endometritisi prouzrokovani gljivičnim ili kombinovanim

bakterijskim i gljivičnim infekcijama znaju da budu vrlo tvrdokorni naročito kod produženih antibiotskih tretmana.

Preventivno se rizik nastanka endometritisa kao posledica unošenja infekcije mogu u velikoj meri eliminisati ili bar smanjiti na minimum izvođenjem minornih hiruških intervencija kojima se vrši korekcija anatomskih defekata i to su:

1. *Postavljanje Kaslikovog šava kojim se zatvara vulva kod mladih kobila sve do odlaska u priplod*
2. *Korekcija uretralnog kanala čimese sprečavaju negativni efektom urovaginekoja se radi posle parenja*
3. *Korekcija anusa u cilju sprešavanja rekto vaginalnih „suza“ a izvodi se posle ovulacije.*

Ovi korektivni hiruški zahvati nisu komplikovani i postali su deo rutinske prakse a sve u cilju sprečavanja uticaja spoljašnjih faktora na plodnost kobila.

Lečenje endometritisa kod kobila najčešće podrazumeva primenu antibiotske terapije. Njihova primena je rutinska i praktikuje se neposredno posle parenja, ali je često kontroverzana a ne retko nepotrebna ili preterana. Najbolja je primena antibiotika na osnovu laboratorijskog nalaza biograma i antibiograma. Kod kobila nije retka pojava i superinfekcija ali se tretmani preporučuju samo na osnovu senzitivnosti prema izazivaču.

Postojanje infekcija izazvanih gljivicama su veoma komplikovane i teške čak i kada su potvrđene laboratorijskom analizom. Promena terapije je veoma ograničena i najčešće se koristi Nystatin, Clotrimazole a uobičajeno je ispratiti ovu terapiju jodnim rastvorima ili Chlorhexidin-om koji iako veoma efikasan može da bude iritantan za sluzokožu endometrijuma. Pojedine kobile reaguju senzitivno čak i kod intrauterine primene rastvora jodnih preparata.

Egzogeni uzročnici steriliteta koji kroz parenje najčešće provociraju zapaljenske procese u endometrijumu izazivaju sterilitet a nastaju kao posledični efekat nemogućnosti samočišćenja uterusa kobila. Ejakulat ili seme kod kobila koje nemaju mogućnost samočišćenja je praćen prisustvom bakterija i polimorfonuklearnih granulocita u materici koji imaju slabu limfatičnu funkciju kao i slab miometrijalni imunski odgovor. Kod normalnih i zdravih kobila tokom akta parenja i osemenjavanja postoji imunski odgovor a u njega su uključeni još i prostaglandini i oksitocin. Materica kroz cerviks kontrakcijama vrši materičnu drenažu i višak sperme sa prisutnim mikroorganizmima uz imunski odgovor biva evakuisan i to se zove materični klirens.

Ovo je jasan put kojim se kod jednog broja kobila javljaju uporni endometritisi dok kod ostalih oplodnja biva završena bez posledica po reproduktivno zdravstveno stanje. Još uvek se ne znaju razlozi za loš materični klirens kod jednog broja kobila ali postoje pretpostavke da zbog same građe

materice veoma lako dolazi do atrofiranja i endometrijuma i miometrijuma što ugrožava njihov imunski odgovor. Uz ovu konstataciju se mora napomenuti da kod starijih kobila dolazi do atrofije endometrijuma i slabost u samočišćenju. Nekada je očigledan razlog prethodna trauma. Takođe je dokazano da kod kobila sa problematičnim klirensom postoji dominacija progesterona. Osim prisustva progesterona uočena je i slaba aktivnost limfnog klirensa. Kod takvih kobila mogu se napraviti pomaci u lečenju primenom oksitocina, uterusnim lavažama i primenom prostaglandina. Prisustvo gnojnog sadržaja je cilj ka kojem je uvek usmerena svaka terapija, obzirom da je on taj koji sakriva i štiti bakterijski sadržaj.

Nutritivni stres je u direktnoj vezi sa ranim embrionalnim uginućem. Iako može biti preventivno sprečen nisu retki slučajevi steriliteta nastalih unošenjem hrane koja u sebi sadrži materije odgovorne za gubitak graviditeta i nastanak steriliteta.

Efekat stresa koji nemaju uticaj na gubitak embriona a vezani su za rast adrenokortikotropnog hormona su ždrebeći estrus, uprezanje životinje do 90. dana ždrebnosti pa čak ni dijareja.

Cervikalna trauma

Najčešće nastaje kao posledica povrede tokom parenja. Osim laceracije cerviksa posledično se javljaju adhezije praćene infekcijom. Povreda cerviksa može da nastane kao posledica neiskustva pastuvara, čoveka koji je zadužen za pripust u ergeli ili nedovoljno uvežbanog pojedinca. Pripust kobile se obavlja najbolje u prostorijama koje su slabo osvetljene a pastuv reaguje na kobilu sa predovulatornim folikulom vizuelno i detekcijom feromona. Prilikom pripusta najbolje je da pri upoznavanju kobile i pastuva između njih postoji visoka zaštitna ograda. Potom se razdvajaju, kobili se postavljaju tzv. ćusteci kako ne bi bila u mogućnosti da se izbaci zadnjim nogama i povredi pastuva. Samog pastuva vode dva lica, sa obe strane na povodnicima jednake dužine i ne dozvoljavaju mu skretanje nego ga privode direktno kobilu. Priprema pastuva je ovde od velikog značaja po ishod skoka jer pastuvar ne sme da dozvoli da pastuv uđe u skok sa razvijenom i eregiranom pečurkom kavernoznog tkiva na vrhu penisa. Pečurka treba da se razvije tek posle skoka i važna je u regulaciji zatvaranja unutrašnjih materičnih usta i eliminaciji viška sperme. Laceracija cerviksa može da nastane prilikom skoka pastuva sa eregiranom penisnom pečurkom ili pri preranom silasku pastuva sa kobile. Osim laceracije cerviksa izazvanog posledicom loše izvedenog pripusta, povreda cervikalne sluzokože može da nastane kao posledica teškog porođaja. Povrede cerviksa koje se ubrajaju u egzogene uzročnike steriliteta su i nestručne intervencije u tretmanu prethodnih endometritisa, lavaža uterusa, inspekcija cerviksa i uterusa u dijagnostičke svrhe pa čak i izvođenju veštačkog osemenjavanja. Sluzokoža cerviksa i uterusa spadaju u jednu

od najosetljivijih u životinjskom svetu, pa i najmanje povrede ostavljaju lokalizovane hemoragične promene promera 1-2 mm, koje perzistiraju na tim mestima sve do njihovog otkrivanja i lečenja. Ovakve promene su čest razlog slabog ili nepotpunog zatvaranja cerviksa ždrebni kobilica i često osnovni uslov zbog kojih nastaju rana embrionalna uginuće. Nedovoljno zatvaranje cerviksa sa posledičnim ranim embrionalnim uginućem je i čest uzrok endometrijalne atrofije na mestu nidacije.

Prilikom prirodnog pripusta mogu da se zabeleže i vaginalna krvarenja. Izuzetno je važno pravilno postupiti u ovakvim situacijama. Krv je spermicidna i može da utiče na rezultat parenja. Sa druge strane prisustvo hemoragije može da ugrozi plodnost kobile, jer na mestu povrede mogu da se razviju adhezije i fibrinske tvorevine koje će ograničavati vaginalnu ili cervikalnu motoriku. Ovakvi incidenti ponekad mogu biti uzročnici i vaginalne perforacije i zahtevati hirušku intervenciju. Te takozvane vaginalne suze mogu biti i peritonealne ili retroperitonealne u zavisnosti od mesta nastanka i moraju biti lokalizovani i tretirani. Najčešći uzroci nastanka ovakvih stanja su greške pri odabiru pastuva tj. disproporcija pastuva i kobile. Kao uzročnih tzv. vaginalnih suza se navode i vaginalno varikozno krvarenje ne mora da ima bitan značaj po reproduktivnu budućnost kobile.

Uporno parenje kao uzrok endometritisa

Odbrambeni mehanizam uterusa suočava se sa brojnim faktorima koji mogu da ga kompromituju i izazovu neželjene efekte sa posledicama. Endometrijum uterusa ima svoje odbrambene sposobnosti. Lokalni inflamatorni odgovor predstavlja mehanizam odbrane uterusa na prisustvo stranih inzulata, mikroorganizama i semena koji se unose kroz materična usta prilikom parenja. Neutrofili, antitela i komplement su prisutni u uterusu prilikom prodora stranih agenasa u lumen uterusa. Lokalni odbrambeni mehanizam se sastoji u sadejstvu antigena i komplementa prema bakterijama koje bivaju otklonjene fagocitozom. Mehanička evakuacija sadržaja iz uterusa se sastoji u mehaničkom odstranjivanju bakterija i inflamatornih bioprodukata.

Kod svih kobilica se posle parenja javlja prolazni endometritis parenja, koji je potpuno fiziološki normalan i većina kobilica ima sposobnost da samoišči endometrijum na pravi način.

Inflamatorna reakcija u uterusu dostiže maksimum 6-12 h posle veštačkog osemenjavanja a uterus eliminiše suvišnu spermu. Potpuno samočišćenje inflamatornog procesa se može očekivati 4-5 dana posle ovulacije a u zavisnosti od dobrih uslova za preživljavanje konceptusa. Kobile normalno imaju mogućnost mehanizma samočišćenja uterusa posle oplodnje. Endometritis kao posledica upornog pripuštanja pastuva nastaje ili perzistira u slučaju izostanka njihovog prirodnog odbrambenog mehanizma. Svaki tretman koji bi se primenio se preporučuje tokom estrusa a pregled vrši pre primene bilo kakvih

tretmana a posebno onih koji bi zahtevali ponavljanje. Uočavanje znakova iritacije uterusa upornim parenjem je znak za pregled i dijagnostiku.

Egzogeni uzročnici steriliteta kod kobilica

Nutritivni faktori

Estrogeni poreklom iz biljaka ili fitoestrogeni su prisutni u leguminozama koje su uključene u ishranu životinja pa tako i konja imaju uticaj na plodnost. Njihov uticaj na metabolizam je dosta dobro proučen kod ljudi i laboratorijskih životinja. Pašnjaci sa mešanim travama i detelinom, lucerkom su mesto gde kobile na ispaši mogu uneti fitoestrogene u organizam. Prisustvo visokog nivoa fitoestrogena coumestrola i metabolita 4-metoxycoumestrola poreklom iz leguminoza posle ispaše je potvrđeno u krvi kobilica i može se uporedno ispitivati njihova koncentracija u krvnoj plazmi kobilica i uzorku hrane sa pašnjaka metodom HPLC. Fitoestrogeni su složeni estrogeni i njihovo prisustvo je veoma veliko u leguminozama, detelini ili alfalfa peletima. Struktura fitoestrogena odgovara strukturi endogenog estrogena (17- β -estradiola) čineći im konkurenciju, vezujući se se na receptorima predviđenim za endogene estrogene. Kada dođe do vezivanja fitoestrogena za receptore, oni više nemaju istu aktivnost kao endogeni estrogeni već počinju da izazivaju poremećaje u endokrinom sistemu kobilica, posebno uticajem na polni ciklus. Dokazano je takođe da koncentracija fitoestrogena poreklom sa mešanih pašnjaka trave i deteline daje porast koncentracije u serumu kobilica tokom toplijih meseci a da je niža u hladnijem periodu. Ovo je veoma značajno jer su fitoestrogeni više prisutni u hladnijim mesecima novembar-mart. Na porast koncentracije fitoestrogena u krvi toplijih meseci na pašnjacima sigurno ima i prisustvo fitoestrogena u ostatku obroka koje kobile unesu u štali tokom noći i jutro ili prihranom na samom pašnjaku. Sezonalnost polnog ciklusa kao i kratka sezona parenja kobilica samo do kraja juna tekuće godine sa porastom koncentracije coumestrola u krvnoj plazmi značajno može da utiče na pojavu steriliteta iregularnim polnim ciklusom, tj . izostankom dominantnog ovulatornog folikula. Estralni ciklus se može pratiti na osnovu plazma estradiola (E2) , progesterona (P4) uz ultrazvučnu biometriju folikula. Detekcija koncentracije coumestrola i njegovog metabolita 4-methoxycoumestrola se otkrivaju tačnom hromatografijom kombinovanom sa masenom spektrometrijom. Fitoestrogeni u plazmi kobilica tokom unošenja dužem vremenskom periodu ne dovodi samo do izostanka ovulacije već i do edema uterusa kao i nagomilavanja materičnog fluida. Unošenjem coumestrola i njegovog metabolita u organizam ishranom estrogenim biljkama povećava se uticaj na reproduktivne sposobnosti kobilica i rizik od potencijalnih endokrinih poremećaja.

Toksini

Zeralenon je estrogenu mikotoksin ZEA, koji uglavnom stvara *Fusarium Graminearum*, vrsta koja je u kolonijama prisutna u brojnim žitaricama i to u kukuruzu, ovsu, ječmu, pšenici kao i u svim žitaricama prisutnim u stočnoj hrani. Nastaje u periodima hladnog i vlažnog perioda uz interakciju više faktora kao što su povećana vlaga u žitaricama. Njegovo prisustvo izaziva infekcije praćene temperaturom i mikrobiološkom interakcijom. Generički Zeralenon je ime derivata *Gibbrella zeae*. Rastvorljiv je u bazama, etru, benzenu, acetonitritu, etilalkoholu i virtuelno u vodi. Kod ljudi i različitih vrsta životinja se javlja u dva stereo izometrijska metabolita a to su α i β ZOL. Minorni derivat oba metabolita je ZAL, Zeranol. Rezultat njihove redukcije. Često je uzrok kontaminacije žitarica i žitnih hraniva kojima se hrane jeleni, ovce, krave i konji. Efekat ZEA-zearalenona, podrazumeva estrogenu strukturu veoma sličnu prirodnim estrogenima kao što su: estradiol, estron i estriol.

Estrogenu potencijal ZEA je veći od prisustva prirodnih estrogenu. Zearalenon kod mladih izaziva estrogenu hiperplaziju kao i cervikalni kancer kod žena. Karinogeneza je dokazana i kod laboratorijskih životinja. Takođe je i uzročnik embrionalnog mortaliteta, izaziva promene na tireoideji, hipofizi i nadbubregu. Utvrđene su i tumefakcije vulve, atrezije folikula, promene slične apoptozi, intezivne ćelijske proliferacije u uterusu i jajovodima.

Utvrđeno je i da postoji sezonska varijacija u koncentraciji zearalenona u žitaricama i njihovim plodovima.

Uticaj lekova na sterilizaciju kobila

Posebni zahtevi vlasnika i trenera konja često su zasnovani na primeni medikamentoznih preparata koji bi trebali da utiču na performanse sportskih grla. Iako zabranjene supstance u sportskim takmičenjima steroidise često koriste kao stimulansi tokom rasta i puberteta grla koji još nisu ušli u takmičenja. Primena steroidnih preparata je najčešća u periodu između prve i druge i druge i treće godine života kako muških tako i ženskih grla. Primena ovih preparata se vrši da bi se kod konja postigao zadovoljavajući rast i rast mišićne mase. Ovi preparati se uglavnom dugo zadržavaju u organizmu i sporo metabolišu. Osim primene steroidnih anabolika sportska grla su izložena primeni medikamentoznih preparata koji podržavaju krvnu sliku, visok nivo gvožđa u organizmu, hematokrit i dr. Ovakva grla su sa svih aspekata izložena visokom stresu, ne samo po pitanju administracije lekova već su česta seljenja i putovanja takođe razlog za stresni život sportskog grla. Sportskim grlima koja imaju ovakva iskustva, po završetku karijere fertilitet predstavlja ozbiljan problem, pa se takva grla ne forsiraju. Ovaj deo stresa eventualno samo dug vremenski period odmora na ispaši i apsolutnom miru uz obaveznu kontrolu reproduktivnog statusa može da dozvoli ulazak u reproduktivni ciklus. Veoma se često dešava da najpoznatija takmičarska grla imaju trajni oblik sterilizacije i nikad ne mogu da uđu u

ovulatorne cikluse koji bi rezultirali koncepcijom. Pod pojmom negativnog uticaja lekova možemo ubrojati i sve stručne greške koje mogu biti primenjene a održavaju se na reproduktivno zdravlje kobile. Pre svega tu svrstavamo postupke kojima se u ranoj dijagnostici graviditeta propusti dijagnoza graviditeta. Primena prostaglandinskih i kortikosteroidnih preparata u periodu postojanja embriona može da izazove ne samo njegovo uginuće već može da dovede posebno kod starijih grla do distrofije uterušnih glandula a koji će biti razlog trajnog steriliteta.

Zoohigijenski uslovi kao uzročnici steriliteta

Loši ambijentalni uslovi držanja kobilica, pogrešno postavljene štandove ili boksovi sa pogrešnim izborom podloge, zadržavanje mokraće i ostalih ekskreta bez mogućnosti njihove redovne evakuacije iz objekta, konstantnog prisustva podzemnih voda koje sadrže infektivni materijal, postojanja nagiba mogu značajno da utiču, prvenstveno na stanje akropodijuma a zatim i na reproduktivni status.

Tehničko-tehnološki uzročnici steriliteta

Pod ovim pojmom možemo ubrojati sve one stručne greške koje mogu biti primenjene a održavaju se na reproduktivno zdravlje kobile. Pre svega tu svrstavamo postupke kojima se vrši nepravilna primena i upotreba aparata i medicinskih sredstava kod dijagnostikovanja statusa uterusa, embriotransfera, veštačkog osmenjavanja, lavažom uterusa pogrešnim koncentracijama ili iritantnim solucijama pri čemu se oštećuje sluzokoža cerviksa i uterusa.

Litertura:

1. Botelho, M., M.R. Rebordao, A.M. Balvao, et al. 2012. Phytoestrogen coumestrol and its metabolite in mares' plasma after clover mixed pasture and alfalfa pellets ingestion. AAEP Publication 132:49-52.
2. Ferreira-Dias G, Botelho M, Zagrajczuk A, Rebordão MR, Galvão AM, Bravo PP, Piotrowska-Tomala K, Szóstek AZ, Wiczkowski W, Piskula M, Fradinho MJ, Skarzynski DJ. Coumestrol and its metabolite in mares' plasma after ingestion of phytoestrogen-rich plants: Potent endocrine disruptors inducing infertility. Theriogenology. 2013 Oct 1;80(6):684-92. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.002. Epub 2013 Jul 9.

**MANIPULACIJA ESTRALNIM CIKLUSOM KRAVA PRIMENOM RAZLIČITIH
METODA SINHRONIZACIJE**

***MANIPULATION OF BOVINE ESTRUS CYCLE USING DIFFERENT
SYNCHRONIZATION METHODS***

Dovenski Toni, Trojačanec Plamen, Petkov Vladimir, Atanasov Branko

*Fakultet veterinarske medicine Skopje, Univezitet Sv. Kiril i Metodij,
Skopje R. Makedonija*

Kratak sadržaj

Intenzivna proizvodnja na farmama mlečnih krava i jednostrana selekcija na količinu i kvalitet mleka, dovela je neminovno do pada reproduktivnih potencijala ovakvih grla. Međutim, razvoj reproduktivne biotehnologije, t.j. metoda asistiranе reprodukcije omogućava nam da delimično kompenzujemo pad fertilne sposobnosti mlečnih krava. Jedna od najviše raširenih metoda (posle veštačkog osemenjavanja) je sinhronizacija estrusa, kojom uspešno možemo manipulirati estralnim ciklusom i tempirati najpogodnije vreme za V.O. Iako postoje brojni protokoli za sinhronizaciju estrusa krava, mi smo u ovom preglednom radu prikazali pored najosnovnijih i najčešće primenjivanih hormonskih metoda, također i najnovije metode koje još uvek nisu u širokoj primeni na našim prostorima. Najpre je obrazložen koncept razvoja folikulinskih talasa tokom estralnog ciklusa, da bi olakšali razumevanje suštine sinhronizacijskih protokola. Zatim su navedeni najvažniji metodi, počevši od sinhronizacije prostaglandinima i primenom progestagenskog tretmana, pa do protokola zasnovanim na upotrebu GnRH, samostalno ili u kombinaciji sa drugim hormonima (OvSynch, PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch).

Cilj ovog rada je da prikaže veterinarima praktičarima mogućnosti primene različitih protokola za sinhronizaciju odn. indukciju estrusa kod goveda, kao i očekivan uspeh fertilizacije posle njihove primene.

Ključne reči: Estrus, sinhronizacija, krava, prostaglandini, progestageni, GnRH.

Summary

Intensive dairy farming and one-sided selection of the quantity and quality of milk, has led inevitably to the fall of the reproductive performances of dairy cows.

However, the development of reproductive biotechnology, namely of assisted reproductive technology allows us to partially compensate decline of the fertile capacity of dairy cows. One of the most frequently used method (after artificial insemination) is estrus synchronization, which can successfully manipulate with estrous cycle and determine the best time for AI. Although there are numerous protocols for synchronization of estrus in cows, in this paper we have shown the most basic and most used hormonal methods, also the most recent methods that are not yet widely used in the region. At the beginning, in order to facilitate understanding of the essence synchronizing protocol, the concept of the development of follicular waves during the estrus cycle has been explained. Then, the most relevant methods, as synchronization using prostaglandins and progestogens as well as the protocol based on GnRH, alone or in combination with other hormones, has been described (OvSynch, PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch).

The aim of this paper is to present to veterinary surgeons practitioners the possibilities of different protocols for synchronization and induction of estrus in cattle, as well as expected results of fertilization after their application.

Key words: Estrous synchronization, cow, prostaglandins, progestogens, GnRH.

Uvod

Reproduktivna biotehnologija odnosno asistirana reprodukcija, kako se u novije vreme naziva, je oblast koja se, s ciljem poboljšanja stočarske proizvodnje, intenzivno razvijala u prošlom veku i koja još uvek napreduje. Ona je u stvari najbolji dokaz kako se bazična naučna istraživanja mogu preneti u rutinskoj praksi. Postoje više metoda koje se danas upotrebljavaju i možemo ih hronološki podeliti u 4 generacije. Prva i najstarija je **Veštačko osemenjavanje**, sledeća se razvila generacija **EmbrioTransfera** odn. MOET-a, treća se naziva **generacija In vitro fertilizacije** koja uključuje mnoge srodne metode (IVP, utvrđivanje pola embriona i spermatozoida, IVF sa Ovum pick-up tehnikom ...) i kao najnovija je **generacija Transgeneze** – kloniranje, upotreba embrionalnih STEM i GERM ćelija, kao i genetskih markera u selekciji (Marker-assisted selection) i dr. (Thibier 2005, Bertolini and Bertolini 2009).

Posle veštačkog osemenjavanja, koja pored toga što je najstarija, ujedno je i najmasovnija biotehnička metoda u kravarstvu (više od 100 miliona godišnje), druga po masovnosti je sinhronizacija estralnog ciklusa krava. Postoji veći broj protokola koji se danas upotrebljavaju u tu svrhu, ali su svi bazirani na dva osnovna principa: skraćivanje estralnog ciklusa (lutealne faze) ili njegovo produžavanje. Uglavnom se primenjuju hormonski preparati: prirodni ili sintetski analozi Prostaglandina, Progestagena, Gonadotropnih i Gonadorilizing hormona, samostalno ili u odgovarajućoj kombinaciji (Moore i Thatcher 2006).

Pored hormonalnih postoje i nehormonalne metode, koje se najčešće upotrebljavaju kod vrsta sa sezonskim karakterom razmnožavanja (mali preživari, ekvidi...) i to na osnovu manipulacije svetlosnim režimom. Ove metode nećemo razmatrati u nastavku ovog pregleda.

Prednosti upotrebe metoda za sinhronizaciju estrusa krava su sledeće:

1. Omogućavaju organizovan i efikasan pristup veštačkom osemenjavanju
2. Smanjivanje vremena i radne snage potrebne za detekciju estrusa
3. Poboljšanje evidencije i menadžmenta prilikom grupiranja krava
4. Ušteda radne snage prilikom korišćenja napredne genetike za dugovečnost i poboljšanje produktivnosti mlečnih krava
5. Važan instrument za lakši menadžment redovnog teljenja u intervalu od 12-13 meseci
6. Preduslov za primenu MOET programa i IVF
7. Ekonomska profitabilnost

Koncept razvoja folikulinskih talasa

Da bi omogućili čitaocu ovog teksta da lakše razume suštinu procesa sinhronizacije estrusa i njegovu primenu, obrazložićemo ukratko na samom početku koncept folikulinskog razvoja kod krava. Razumevanje načina i dinamike rasta folikula tekom estralnog ciklusa olakšano je revolucionarnim razvojem ultrasonografije 80-ih godina prošlog veka. Zbog toga, neki autori (Bertolini and Bertolini 2009) svrstavaju ultrasonografiju u veoma važnu alatku 2. generacije biotehničkih metoda u reprodukciji i pored toga što ona to nije u pravom smislu tog pojma. Svakodnevnom ultrazvučnom opservacijom jajnika i dinamičnih promena koje se dešavaju na njima otkiven je šablon rasta ovarijalnih struktura, pre svega antralnih folikula ali i žutog tela.

Na osnovu tih ispitivanja moglo se zapaziti da se rast folikula, odvija na jedan prilično regularan način (Sirois i Fortune 1988, Savio i sar. 1988, Fortune i Sirois 1989, Lavoisier i Fortune 1990, Roche 1996, Dovenski 1997). Drugog do četvrtog dana nakon ovulacije zapaža se pojava populacije (kohorte) antralnih folikula veličine 3 do 5 mm (definisano kao početak 1. talasa). Pojavljivanje i rast populacije folikula je nezavisan o tome na kom je jajniku bilo smešteno žuto telo. Nekoliko dana kasnije jedan od njih se jasno razlikuje po veličini i raste ubrzano, preuzimajući dominaciju, t.j. suprimirajući rast ostalih. Nakon dostizanja maksimalnog dijametra, postoji kratka faza stagnacije, da bi posle toga ovaj folikul regresirao. Trajanje ovog talasa je oko desetak dana, tako da oko 12-14 dana (za cikluse s 2 talasa), ili oko 9. dana za cikluse s 3 talasa, najveći folikul iz novog talasa preuzima dominaciju. U zavisnosti od toga dali će doći do regresije žutog tela (kod ne gravidnih) ili ne (kod gravidnih životinja) sudbina ovog novog folikula je da ovulira (kod prvih) ili regresira (atrezira) kod drugih.

Poznato je da se kod krava rast folukula od veličine oko 300 μm do veličine 3-5 mm, traje oko 30 dana (Lussier i sar. 1987) i označava se kao spora

faza folikulogeneze, a objašnjava se njihovom gonadotropnom nezavisnošću. Posle toga dolazi do bržeg rasta folikula (do 1-2 mm/dan), a iniciran je porastom koncentracije FSH (gonadotropno zavisan rast). U ovom periodu folikulogeneza se odvija u nekoliko faza:

1. *faza regrutacije* t.j. pojavljivanja, kada 4-8 folikula iz jedne populacije (gnezdo, cohort) folikula manjih od 5 mm u prečniku, počinju da rastu paralelno.

U 2. *fazi selekcije*, ili još nazvana i *faza devijacije*, jedan će folikul biti izabran (selektiran) i on postupno postaje veći od ostalih tako da “dominira” nad ostalim.

Tokom 3. *faze dominacije*, subordinantni (podređeni) folikuli regresiraju i ne pojavljuju se novi folikuli veličine ≥ 5 mm (fig. 1). Odavde proizilazi jedna moguća hipoteza da dominantni folikul, kada je jednom selektiran, regulira razvoj ostalih folikula, tokom faze svoje dominantnosti. Dakle, dominantni folikul može, na neki način, prouzrokovati “smrt” svojih sestara-folikula iz istog gnezda (kohorte) i može također supresirati izvesno vreme novi talas folikularnog rasta. Utvrđeno je da se u ovoj fazi povećava sekrecija estrogena s jedne strane i količina inhibina s druge. Ovaj proteinski hormon, putem negativne povratne sprege sprečava FSH sekreciju u adenohipofizi, pa samim tim verovatno i rast ostalih folikula.

Vizuelizacija žutog tela kao ehogene strukture sferičnog ili elipsastog oblika, različitog intenziteta od ostalog tkiva jajnika moguća je već 2. dana posle ovulacije. Njegove granice u početku nisu najjasnije i merenje njegovog prečnika je otežano. To je stadijum kada je ovulirani folikul ispunjen krvavim ugruškom (Corpus haemorrhagicum). Funkcionalna sposobnost morfološki prisutnog CL počinje oko 5. dana, kada se nivo progesterona podiže iznad 1 ng/ml i produžava svoj razvoj linearnom funkcijom sve do sredine estralnog ciklusa; oko 12. dana za cikluse s normalnim trajanjem dostiže svoj maksimum (prečnik >25mm).

Kada nastane luteoliza kod negravidnih krava pad koncentracije progesterona odvija se brže od morfološke regresije žutog tela i zbog toga manje iskusni operator može da pogreši u proceni njegove funkcionalnosti. Također, veoma često prilikom ultrazvučnog pregleda možemo da vidimo žuto telo sa centralno postavljenom šupljinom ispunjenom tečnošću. Iako neki autori ovakvu pojavu nazivaju cistično žuto telo, dokazano je da to nije patološka struktura i da je možemo naći kod gravidnih životinja (Pearson i Ginther. 1988, Grygar i sar. 1992, Dovenski 1997). Zbog toga pravilno je ovakve strukture nazivati žuto telo sa centralnom lutealnom šupljinom (CLC - central luteal cavity) i ovakva žuto tela imaju čak i bolju produkciju progesterona (Grygar i sar. 1997, Dovenski i sar. 1999)

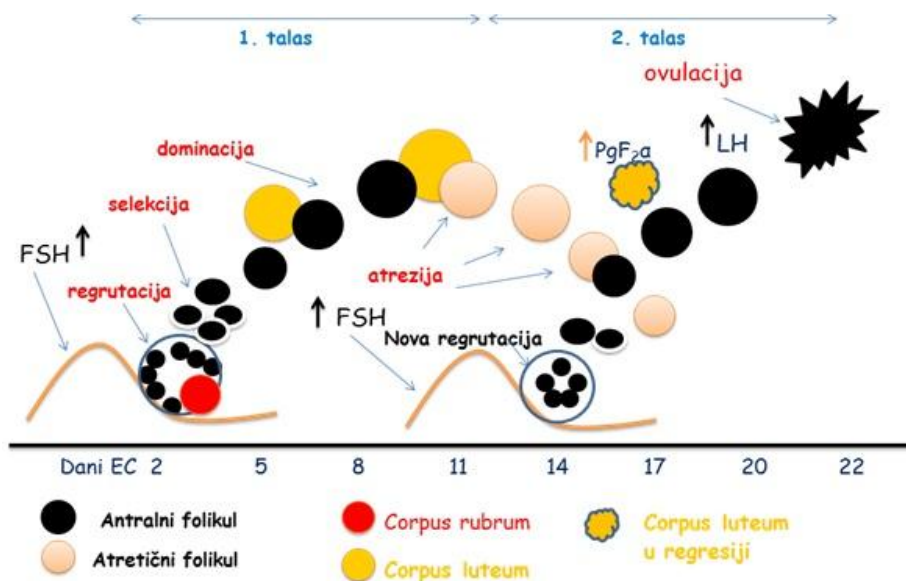


Figura. 1. Šablon razvoja folikulinskih talasa tokom estralnog ciklusa krava

Upotreba prostaglandina za indukciju estrusa (skraćivanje lutealne faze E.C.)

Primena prostaglandina ($\text{PgF}_{2\alpha}$) je osnovni metod za sinhronizaciju estrus krava i bazirao se inicijalno na veštini veterinaru da palpira rektalnim putem žuto telo i determinira njegovu funkcionalnost. Osetljivost žutog tela na prostaglandinski (PG) nadražaj/stimulus traje 11-12 dana (od 5.-6. do 17.-18.) i zavisi od postojanja receptora za njegovo vezivanje. Refraktarnost CL na aplikaciju PG je od 17. dana prethodnog ciklusa do 5. dana narednog (fig. 2). Najjednostavniji sinhronizacijski protokol prikazan je na fig. 3. i verujemo da je gotovo svaki veterinar imao iskustva sa njegovom primenom. Vrlo važan preduslov je da životinja ima redovan estralni ciklus t.j. funkcionalno žuto telo i **da je negravidna**. Njen nedostatak je što je obavezna detekcija estrusa koji se pojavljuje u širokom intervalu od 2 do 5 dana, u zavisnosti od faze rasta folikulinskih talasa (regrutacija, selekcija, dominacija, regresija).

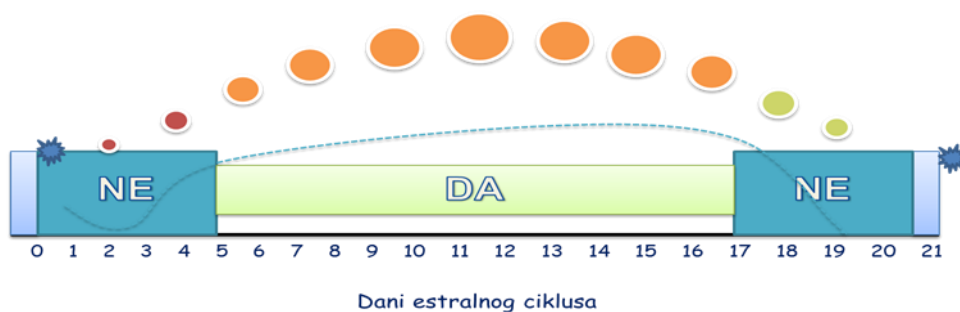


Figura. 2. Razvoj žutog tela tokom estralnog ciklusa krava i period njegove osetljivosti na prostaglandin (DA) ili refraktarnosti (NE)

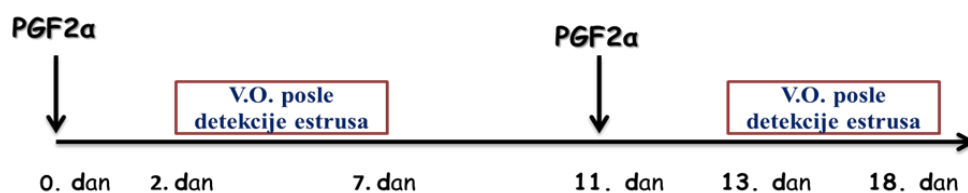


Figura. 3. Klasičan sinhronizacijski protokol primenom $\text{PGF}_{2\alpha}$

Na fig 4. pikazan je protokol „ponedeljak ujutro“ prema kome svaki ponedeljak apliciramo PG injekciju životinjama koje nusu osemenjavane, da bi ih u toku radne nedelje osemenili posle detektiranog estrusa. Krave koje ne pojave znakove estrusa dobijaju drugi tretman sledećeg ponedeljka, pa još jednom za 2 nedelje sve do pojave fertilnog estrusa.

Mnogo bolji učinak u sinhronizaciji estrusa ima primena PG u kombinaciji sa Gonadoreleasing hormonom ili progestagenima, što ćemo prikazati u nastavku pregleda.

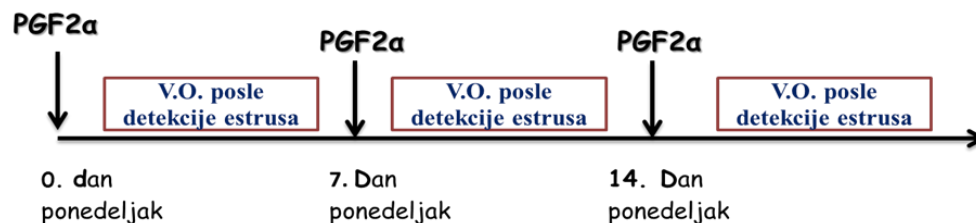


Figura. 4. “Monday morning” protokol

Sinhronizacija estrusa primenom progestagenskog tretmana

Postoje više metoda koji su zasnovani na produživanju progestagenske faze estralnog ciklusa, odnosno održavanje visokog nivoa progesterona čak i posle regresije žutog tela. Estrus se javlja 2 do 5 dana posle prestanka tretmana koji može da traje od 7 do 14 dana. Administracija progestagena može biti peroralna - MGA metod (Melengesterol Acetate), intravaginalna - CIDR (Controlled Internal Drug Release), PRID (Progesterone-Releasing Intravaginal Device) ili subkutana (ušni implant) Synchro-Mate B, Crestar metod.

Peroralna aplikacija progestagena (0.5mg MGA/dan) traje 14 dana i može se kombinirati sa primenom PG i GnRH (fig. 5.) *Brown i sar. 1988.*



Figura 5. Modificiran MGA sinhronizacioni protokol sa dodatkom PG i GnRH

Metode koje se baziraju na intravaginalnoj i subkutanoj aplikaciji progestagenskih implantata traju kraće 7-11 dana i podrazumevaju primenu estrogenih hormona na početak i eCG (ekvini horiogonadotropin) na kraju tretmana. Upotreba estrogena je neophodna zbog prekida funkcionalnosti dominantnog folikula i iniciranje novog talasa folikulinskog rasta.

Generalna shema primene progestagenskih tretmana prikazana je u tab. 1.

Tabela 1. Primena progestagenskih implantata za sinhronizaciju estrusa kod mlečnih krava

Aplikacija implanta	Aplikacija PGF2α	Vađenje implanta i aplikacija eCG-a	56. h V.O. - bez detekcije estrusa
0. dan	7.-8. dan	9.-10. dan	12.-13. dan

Intravaginalni CIDR tretman traje u principu 7 dana i može se upotrebiti za sinhronizaciju neosemenjenih krava ili resinhronizaciju krava posle V.O. (fig. 6.)

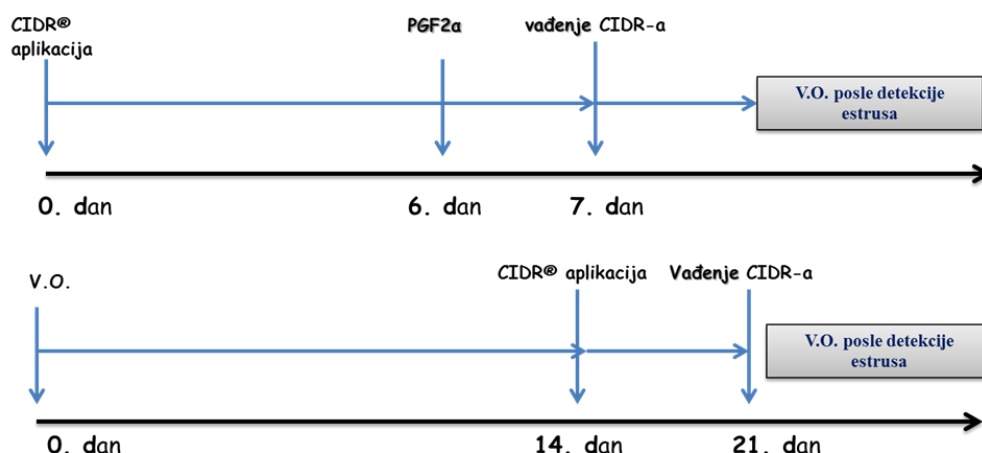


Figura 6. Protokol za primenu CIDR tretmana u sinhronizaciji i resinhronizaciji estrusa krava

Na veterinarskom tržištu u našim zemljama možemo naći još uvek preparat Crestar, koji je ranije bio poznat kao Synchro-Mate B. Silikonski implant impregniran s Norgestomet-om aplicira se subkutano sa spoljašnje strane uva krave, a istovremeno se daje i/m injekcija Estradiol valerate. Visoka doza progestagena koja se 9 -10 dana kontinuirano oslobađa u krvi pacijenta imitira lutealnu fazu EC. Na dan vađenja implanta aplicira se 400-600 IJ eCG-a, da bi izvršili osemenjavanje 48-56 sati kasnije. Kod mlečnih krava neophodna je i aplikacija prostaglandina 48 sati pre završetka progestagenskog tretmana. Postoje podaci da se Crestar metod može upotrebljavati i kod krava i junica koje nemaju redovan estralni ciklus, t.j. kod jedinki s neaktivnim jajnicima (Popovski i sar. 1996, Dovenski i sar. 2006.).

Protokoli za sinhronizaciju estrusa i ovulacije bazirani na primeni GnRH

Ovi protokoli se upotrebljavaju najčešće na farmama s velikom aglomeracijom visoko-produktivnih mlečnih krava i koriste se u kombinaciji sa prostaglandinima. Prve rezultate primene takozvanog PGP programa (Prostaglandin-Gonadoreleasing-Prostaglandin) saopštili su Pursley i sar. 1995. Kasnije je ovaj sinhronizacijski program bio preimenovan kao OvSynch, sa brojnim modifikacijama kao što su PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch. Suština protokola je da se na početku aplicira inicijalna doza GnRH koja dovodi do luteinizacije ili atrezije dominantnog folikula. U tom trenutku počinje novi talas folikulinskog rasta, t.j. regrutacije novih folikula, a istovremeno se stvara i žuto telo, odnosno ovaj hormon pojačava njegovu funkciju. Sedam do osam dana kasnije aplicira se jedna doza prostaglandina koji

dovodi do luteolize i prekida funkcije žutog tela, u trenutku kada je dominantan folikul estrogeno aktivan i brzo finalizira svoj rast u predovulatoran folikul. Dopunska injekcija GnRH-a daje se 48 sati kasnije da bi osigurali ovulaciju i izvršili osemenjavanje sledećih 8-20 sati, s najboljim rezultatima koncepcije oko 16. časa (fig. 7.)

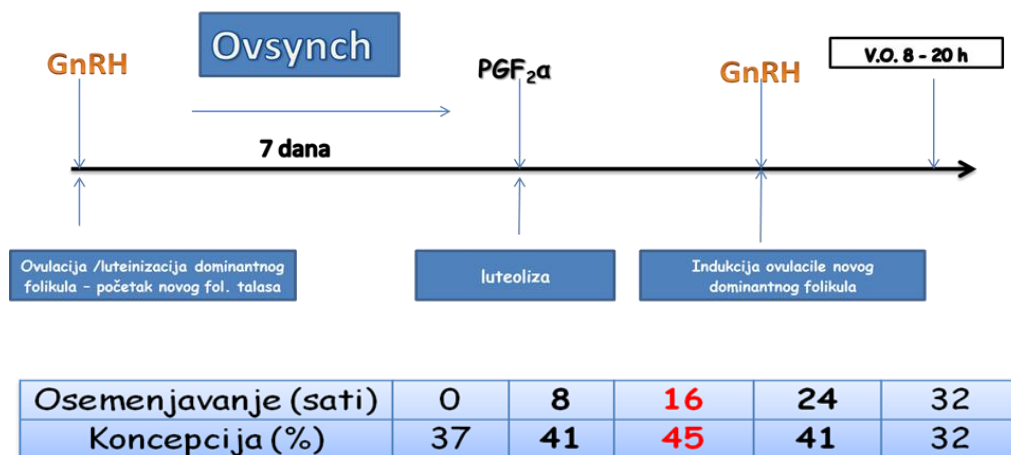


Figura 7. Osnovni OvSynch protokol za sinhronizaciju estrusa i ovulacije i rezultat koncepcije

Dopunski protokoli su razvijeni da bi se otklonili nedostaci osnovnog, t.j. da bi se ostvarila bolja sinhronizacija folikulinskog rasta (fig. 8.). S obzirom da osnovni protokol počinjemo aplikacijom u nepoznatoj fazi ciklusa, ako prvu dozu GnRH damo u metestrusu, neće doći do ovulacije i rezultati će izostati ili će biti slabiji. Zato je razvijen **PreSynch** protokol, koji predviđa 2 injekcije prostaglandina u 14-dnevnom intervalu, a 12 dana kasnije sledi standardni OvSynch protokol. Sledeći protokol **COSynch** je jednostavniji i koristi se za masovnu sinhronizaciju estrusa kod krava koje su najmanje 30 dana posle partusa. Razlika je u tome što se 2. doza GnRH daje za vreme osemenjavanja. Kod **Select Synch** programa ne dajemo 2. dozu GnRH ali da bi izvršili osemenjavanje moramo detektirati estrus posle PgF₂α aplikacije. **Hybrid Synch** program je modifikacija prethodnog, s tim razlikom da se krave koje ne pokazuju znakove estrusa do 3. dana posle PgF₂α aplikacije osemenjavaju istog dana (72. sat) uz dodatnu dozu GnRH. U novije vreme razvijen je i **Heat Synch** program, koji je sličan PreSynch-u, samo što se umesto 2. doze GnRH-a, 24 sati posle 3. doze PgF₂α daje Estradiol Cyprionate (ECP), esterificirana forma 17β Estradiola. Dokazano je da ovaj preparat uspešno inducira ovulaciju odnosno oslobađanje predovulatornog LH (Lopes i sar. 2000).

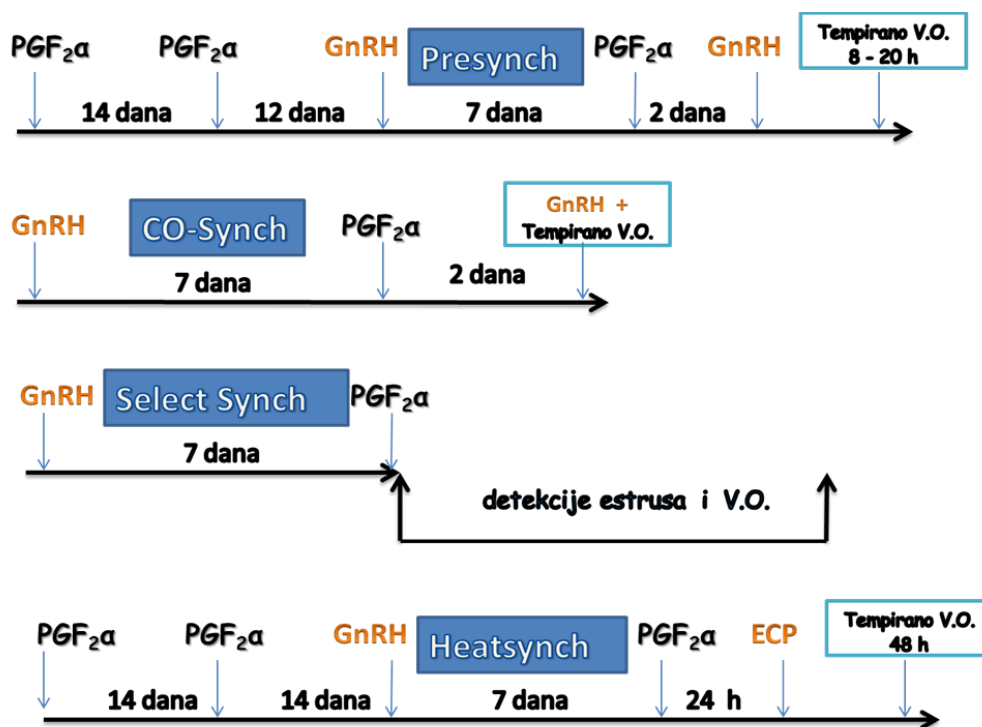


Figura 8. Modificirani OvSynch protokoli za sinhronizaciju estrusa krava

Kao zaključak možemo konstatovati da su predstavljeni protokoli korisnih alatki u asistiranoj reprodukciji. Oni mogu značajno pomoći u menadžmentu reproduktivnog zdravlja na farmama mlečnih krava.

Literatura:

1. Bertolini M and Bertolini LR, 2009, Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning, *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56:184-194
2. Brown LH, Odde KG, King ME, LeFever DG, Neubauer CJ: Comparison of MGA-Prostaglandin F₂ α to Syncromate B for estrus synchronization in beef heifers. *Theriogenology* 30:1-12, 1988.
3. Dovenski T, 1997, Usporedba ehograma jajnika s razinom progesterona i estradiola u krvi krava tijekom spolnog ciklusa, u puerperiju i u jalovih krava, *Disertacija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*
4. Dovenski T, Lj. Kocoski, P. Trojancanec, V. Petkov, K. Popovski, G. Mickovski, Florina Popovska-Percinic & Lj. Mickov 1999, Comparison of ultrasonic morphology of bovine corpora lutea and plasma progesterone concentration

- during estrous cycle and early pregnancy, *Macedonian Journal of Reproduction*, vol. 5. No 1., 47-57.
5. *Dovenski T., Trojacanec P., Kocoski Lj., Popovski K., Petkov V., Atanasov B.*, Effect of norgestomet on successful resumption of ovarian activity in postpartum non-cyclic dairy cows, *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 41 No 4, p. 353, 2006
 6. *Fortune J.E. and Sirois J.*, 1989 The use of ultrasonography to study the regulation of follicular development in cattle and horses. In: *A. Tsafiri and N. Dekel (Editors), Follicular development and the ovulatory response. Ares-Serono Symposia, Rome, Serono Symp. Rev. 23: 11-20*
 7. *Grygar I., Kudlac E., Dolezel R., Nedbalkova J.* 1997, Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity, *Animal Reproduction Science* 49, 77-82.
 8. *Islam R.* 2011, Synchronization of Estrus in Cattle: A Review, *Veterinary World*, Vol.4(3):136-141
 9. *Lavoie M. and Fortune J.E.* 1990, Follicular dynamics in heifers after injection of PGF 2α during the first wave of follicular development, *Theriogenology*, 33: 270
 10. *Lopes, F. L., D. R. Arnold, J. Williams, S. M. Pancarci, M. J. Thatcher, M. Drost, and W. W. Thatcher.* 2000. Use of estradiol cypionate for timed insemination. *J. Anim. Sci.* 78(Suppl. 1):216. (Abstr.)
 11. *Lussier, J.G., P. Matton, and J.J. Dufour.* 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 81: 301-307
 12. *Moore K. and Thatcher W. W.*, 2006 Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle, *J. Dairy Sci.* 89:1254-1266
 13. *Popovski K., Mickovski G., Kocoski Lj., Dovenski T., Trojacanec P. and Petkov V.*, 1996 Effects of hormonal therapy in cows with functional ovarian disorders, *Macedonian Journal of Reproduction*, 2,1, 3-10.
 14. *Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC.* 1995, Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*; 44:915.
 15. *Roche J.F.*, 1996, Control and regulation on folliculogenesis - a symposium in perspective, *Reviews of Reproduction*, 1, 19-27
 16. *Savio J.D., Keenan L., Boland M.P. and Roche J.F.* 1988, Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers, *J. Reprod. Fert.*, 83, 663-671.
 17. *Sirois J. and Fortune J.E.*, 1988, Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39, 308-317.
 18. *Thibier M.*, 2005 The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 235-242

**NEHORMONALNE METODE SINKRONIZACIJE ESTRUSA KOZA S PRIMJENOM
UMJETNOG OSJEMENJIVANJA**

***NON-HORMONAL METHODS AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN DAIRY
GOAT ESTROUS SYNCHRONIZATION***

Grizelj Juraj, Ževrnja Branimira, Folnožić Ivan, Vince Silvijo

*Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Vjekoslava Heinzela 55,
10 000 Zagreb, Hrvatska, jgrizelj@vef.hr*

Kratak sadržaj

Nehormonalne metode (svjetlosni režim i utjecaj mužjaka) sinkronizacije estrusa stada u kozarstvu u skladu su sa sve strožom europskom legislativom vezanom uz korišćenje hormonalnih pripravaka (gestagenskih protokola) u proizvodnji hrane, a napose su važne u organskoj proizvodnji hrane te suvremenim potrošačkim trendovima.

U radu se opisuju nehormonalni protokoli sinkronizacije koji se primjenjuju za provođenje rasplodivanja u sezoni spolne aktivnosti te jednako tako za razdoblje anestrusa, oba s primjenom umjetnog osjemenjivanja (UO). Dosadašnji nehormonalni protokoli nisu uspjeli ostvariti zadovoljavajuću sinkronizaciju ovulacije koja bi osigurala efikasnu provedbu UO na tako sinkroniziranim stadima.

U ovom radu istaknut će se važnost najnovijih FLOCK-REPROD protokola koji su predmet istraživanja projekta „Hormone-free non-seasonal or seasonal goat reproduction for a sustainable European goat-milk market; FLOCK-REPROD”, broj ugovora: 243520, financiranog od strane Europske komisije i 7. okvirnog programa (FP7) koji je okupio istraživače te predstavnike srednjeg i malog poduzetništva iz sedam zemalja Sredozemnog bazena.

Ti se protokoli temelje na korištenju svjetlosnog režima i utjecaja mužjaka uz primjenu UO.

Ključne riječi: nehormonalne metode, sinkronizacija, UO, koza, svjetlosni režim, utjecaj mužjaka.

Summary

This paper presents a non-hormonal methods of synchronization (light treatment and male effect) in dairy goat herds which are in conformity with the EC regulation which restricts the use of exogenous hormones (gestagen protocol) in

food production; they are particularly important in organic food production and modern consumer trends.

This paper describes a non-hormonal synchronization protocols which could synchronize the animals to be bred during the high sexual season and also during anoestrus, both with the use of artificial insemination (AI).

The existing non-hormonal protocols failed to achieve a satisfactory synchronization of ovulation that would ensure effective implementation of the AI on such herds.

This paper will highlight the importance of the new FLOCK-REPROD protocols that are the topic of the research project "Hormone-free non-seasonal or seasonal goat reproduction for a sustainable European goat-milk market; FLOCK-REPROD", Grant Agreement: 243 520, financed by European Commission and 7th Framework Programme (FP7), which brought together researchers and representatives of small and medium sized enterprises from seven countries of the Mediterranean basin.

These protocols are based on the use of light treatment and the male effect using the AI.

Key words: *non-hormonal methods, synchronization, AI, goat, light treatment, male effect.*

Uvod

Uzgoj koza proširio se po svim kontinentima zbog manjeg troška proizvodnje u odnosu na druge vrste, a posebice je važan jer omogućuje poljoprivrednu aktivnost u područjima s nepovoljnim klimatskim uvjetima. Koze su po prirodi izrazito adaptivne na različite biofizičke i okolišne uvjete. U nepovoljnim uvjetima krša krčevići šipražja smanjuju mogućnost pojave požara, a povećavaju ukupnu poljoprivrednu iskoristivost površine neke zemlje, posebice onih na kojima nije moguće uzgajati zahtjevnije vrste ili pasmine.

Danas se sve više susrećemo s trendovima proizvodnje visoko kvalitetnih proizvoda, sve češće organskih, spremnih za tržišnu utakmicu. Za takvu proizvodnju bitan je pasminski odabir koji će ostvariti visoke prinose.

Krenuvši od toga, primjena reproduktivnih i selekcijskih programa i genetskog unaprijeđenja stada predstavlja temelj visokoproduktivnog kozarstva.

U ovom radu prikazane su metode upravljanja reprodukcijom stada koje ne koriste egzogene hormone (gestageni), već se protokoli sinkronizacije sastoje od primjene nehormonalnih protokola (hormone free, sans hormone) ili pak protokola koji sinkronizaciju ostvaruju primjenom prostaglandinskih pripravaka za koje ne postoje restrikcije u korišćenju, uz predhodnu primjenu svjetlosnih režima i utjecaja mužjaka.

Time su ovi protokoli, koji su predmet istraživanja FP7 projekta „Hormone-free non-seasonal or seasonal goat reproduction for a sustainable

European goat-milk market; FLOCK-REPROD”, u skladu s pravilnikom Europske komisije (96/22/EC) koji ograničuje uporabu egzogenih hormona (koje trenutno koristi većina kozara koji na svojim uzgojima primjenjuju UO), a koja će u vrlo skorom vremenu biti dodatno postrožena. Tako je u nekim zemljama Europske unije korištenje vaginalnih spužvica u potpunosti zabranjeno (Švedska); na tržištu su se 2008. godine pojavile spužvice s manjom količinom gestagena (20 mg), a MRL (maximum residue limits) striktno određuje karencu prilikom primjene ovakvih pripravaka (zabrana predaje mlijeka tijekom 11 dana gestagenskog protokola i 4 dana nakon vađenja spužvica).

UO omogućuje brzu difuziju poželjnih genetskih svojstava u sustavu selekcije. Njegovo provođenje zahtijeva dobru sinkronizaciju estrusa i ovulacije u koza. Smrznuto sjeme vrhunskih jarčeva danas u Europi ima visoku vrijednost (i preko 50 eur po pajeti) što potencira važnost dobre sinkronizacije stada koja je do sada nehormonalnim protokolima bila loša, a time je koncepcija nakon UO-a bila niska te kozarima financijski neisplativa.

Karakteristike spolne aktivnosti koza

Koze su sezonski poliestrične životinje čija sezona spolne aktivnosti (puna sezona) u umjerenom klimatskom pojasu traje od sredine ljeta do sredine zime tj. tijekom razdoblja kada započinje i traje skraćivanje trajanja dana, zbog čega ih nazivamo „short day breeders“. To znači da je i sezona jarenja vremenski određena te traje od siječnja do ranog ljeta, s najizraženijim razdobljem u proljeće kada su uvjeti klime i prehrane optimalni za preživljavanje potomstva. Ostatak godine (od 3. do 6. mjeseca) koze se nalaze u razdoblju anestrusa (spolna neaktivnost).

Duljina trajanja dana ovisi o zemljopisnoj širini pa se i sezonalnost razlikuje od jedne regije do druge. Kozama koje su izložene manjim promjenama duljine trajanja dana (tropska i ekvatorijalna područja), sezona spolne aktivnosti traje duže, nego onima u umjerenim područjima, kod kojih je anestrus duži i izraženiji (dublji).

Obzirom na navedeno, opskrba tržišta kozjim mlijekom i mliječnim proizvodima te jarećim mesom izrazito je sezonska.

Ukoliko kozari žele odgovoriti zahtjevima tržišta i opskrbljivati ga svojim proizvodima tijekom cijele godine, a pri tome se bave organskim uzgojem hrane i/ili prate sve strožu zakonsku regulativu, nužno je provoditi reproduktivni management stada koji koristi nehormonalne sinkronizacijske protokole.

Nehormonalne metode sinkronizacije stada

Utjecaj mužjaka

Utjecaj mužjaka ili utjecaj jarca sastoji se od naglog uvođenja spolno aktivnog mužjaka u skupinu prijemčivih ženki koje želimo pariti, a koje su prethodno bile izolirane od mužjaka, kako bi u njih izazvali sinkroniziranu pojavu tjeranja. Ukoliko ga se samostalno koristi, učinkovit je u prijelaznom razdoblju, u vrijeme pred početak prirodne sezone spolne aktivnosti (u dubokom anestrusu nije učinkovit).

Koze su po svojoj prirodi životinje koje spontano ovuliraju, a u slučaju naglog izlaganju stresu (nagle promjene u okolišu kao što je uvođenje mužjaka) postaju životinje s induciranom ovulacijom.

Jarčeve (te sve mužjake u stadu starije od 3 mjeseca) i koze treba u potpunosti međusobno izolirati tijekom najmanje 2 mjeseca prije planiranog uvođenja mužjaka (bez vidnog, slušnog, njušnog i dodirnog kontakta), na udaljenost od najmanje 100 metara.

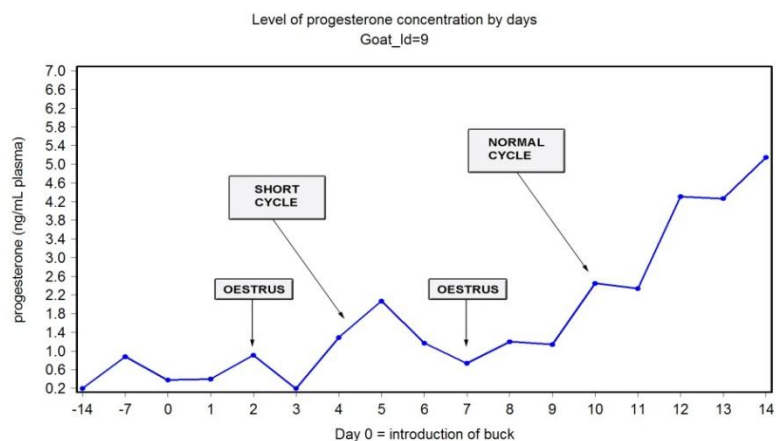
Izolaciju mužjaka treba planirati na način da se mužjak uvodi u skupinu ženki 60 dana nakon početka svjetlosnog režima kratkog dana (odnosno pridodno kratkih dana ili aplikacije implantata melatonina).

Prisustvo spolno aktivnih mužjaka u skupini prijemčivih ženki dovodi do pojave tjeranja i ovulacije kod koza. Kako bi mu povećali učinkovitost i poboljšali sinkronizaciju estrusa, učinak jarca kombinira se s prethodnim podvrgavanjem mužjaka i ženki svjetlosnom režimu i/ili injekcijom/jama prostaglandina, ovisno u kojem razdoblju godine planiramo rasplodivati stado (sezona spolne aktivnosti ili tijekom anestrusa), kako bi bili aktivni u željeno vrijeme.

Utjecaj mužjaka neće imati učinka ukoliko ga samostalno provodimo u vrijeme dubokog anestrusa, a bez prethodne primjene svjetlosnog režima.

Za ostvarenje dobrih rezultata bitno je koristiti mužjake s prethodnim iskustvom parenja, 2-6 godina stare, zdrave, u dobroj kondiciji, s dobro izraženim spolnim nagonom (libidom). U mjesecu koji prethodi uvođenju, isto vrijedi i za ženke, ne smijemo ih podvrgavati nikakvim zootehničkim ili profilaktičkim postupcima (obrezivanje papaka, vakcinacija, itd.). Mužjaci prilikom uvođenja u skupinu ženki trebaju biti opremljeni pregačom kako bismo spriječili neplanirana parenja.

U razdoblju od 1. do 5. dana nakon uvođenja mužjaka, ženke imaju kratki i neplodni ciklus koji može i ne mora biti detektiran od strane jarca. Nakon kratkog ciklusa, u koza se ubrzo (7-11 dana od uvođenja mužjaka) javlja plodni ciklus.



Grafikon 1. Standardni progesteronski profil koze (s kratkim i plodnim ciklusom) nakon uvođenja jarca.

Zbog toga se za potrebe detekcije estrusa u ženki, odnosno parenja ili UO, marker na pregaču jarcu postavlja iza 5. dana. Žuto tijelo refrakerno je 4 dana nakon ovulacije.

Prilikom uvođenja mužjaka treba poštivati omjer od 1 jarca dobrog libida na 10 koza te obvezno osigurati svakodnevnu izmjenu jarčeva koja će osigurati kontinuiranu stimulaciju ženki. Jarčevi opremljeni pregačama moraju biti slobodno pušteni među koze tijekom 24 sata, bez ikakvih ograničenja (barijera, lanaca, držanja u hodniku) sve do parenja ili UO (nikako ih ne odvojiti iz skupine prilikom pojave prvih mrkanja u koza). Tijekom tog vremena uzgajivač mora osigurati jarčevima uredno hranjenje i odmor.



Slika 1. Jarac opremljen pregačom za detekciju estrusa



Slika 2. Obilježene koze; detekcija estrusa

Svjetlosni režimi

Sezonskom spolnom aktivnošću koza može se manipulirati primjenom svjetlosnih režima. Izvedbu i planiranje provođenja svjetlosnog režima treba učiniti najmanje godinu dana prije željenog vremena rasplodivanja.

Važno je ne avansirati pojavu estrusa u koza više od 2 ciklusa godišnje tj. 42 dana u odnosu na datum posljednjeg plodnog parenja. Štoviše, optimalno bi bilo ne avansirati pojavu ciklusa više od 1 ciklusa godišnje tj. 21 dan.

Važno je imati na umu da će primjena svjetlosnog režima i utjecaja mužjaka s ciljem indukcije estrusa i provođenja UO u razdoblju punog anestrusa, izazvati u koza pojavu samo 1 plodnog mrkanja te eventualno još jednog (u slučaju da nije došlo do oplodnje prilikom prvog induciranog estrusa). Nakon toga koze će se opet vratiti u stadij anestrusa.

Izmjena režima dugog dana i režima kratkog dana stimulirat će pojavu spolne aktivnosti u životinja u željeno doba godine. Vrlo je važno da istom svjetlosnom režimu budu podvrgnuti mužjaci i ženke kako bi bili spolno aktivni u vrijeme planiranog rasplodivanja.

Prijelaz s razdoblja dugih na razdoblje kratkih dana mora se provesti naglo. Nikako nije dobro postupno skraćivati dugi dan jer to smanjuje učinkovitost protokola. Razlika u dužini trajanja dugog i kratkog dana mora iznositi barem 4 sata, to je razlika koja će u životinja izazvati optimalnu razliku u sekreciji melatonina.

Nadalje, treba izbjegavati izlaganje životinja svjetlosti van propisanih razdoblja tj. tijekom sati u kojima životinje moraju biti izložene mraku jer to ugrožava cjelokupni svjetlosni režim (npr. ranojutarnja i kasnovečernja mužnja, nadzor jarenja, neplanirani ulasci u objekt, ulična rasvjeta, svjetlo u izmuzištu, svjetiljke za glavu).

Prekomjerno izlaganje režimu kratkog i/ili dugog dana može u životinja izazvati stanje nepodražljivosti (refrakternosti): prekid cikličnosti u koza izloženih kratkim danima duže od 120 dana ili neuredna cikličnost nakon izloženosti režimu dugog dana dulje od 180 dana. Prekratkim pak izlaganjem nećemo ostvariti optimalnu aktivaciju spolne aktivnosti. Potrebno je realizirati režim od minimalno 70 dugih dana i 50 kratkih dana.

Ova manipulacija duljinom trajanja dana primjenom umjetnog osvjetljenja ili korištenjem prirodnog svjetla u određeno doba godine (primjerice prirodni kratki dan kada su prirodni dani sami po sebi kratki) naziva se svjetlosni režim. To je najraširenija metoda za rasplodivanje koza koja se može primijeniti tijekom sezone anestrusa te jednako tako tijekom sezone spolne aktivnosti. Svjetlosni režim sastoji se od izlaganja koza izmjeni razdoblja dugih dana (DD=16h neprekidnog svjetla) i razdoblja kratkih dana (KD= 8-12h neprekidnog svjetla) u točno određeno doba godine.

Za protokole osjemenjivanja koji se planiraju provesti tijekom razdoblja anestrusa, **klasični svjetlosni režim** sastoji se od primjene 90 uzastopnih dugih dana, a zatim 60 uzastopnih kratkih dana.

Za protokole osjemenjivanja koje planiramo provesti tijekom sezone spolne aktivnosti životinje je potrebno podvrgnuti režimu koji se sastoji od **izmjene 90 DD - 90 KD - 90 DD - 90 KD**. Ovaj je protokol testiran za provođenje UO u mjesecu svibnju i studenom, dok se za sve ostale mjesece može provesti, ali još nisu provjereni rezultati. Za provedbu rasplodivanja tijekom mjeseca studenog, ovaj svjetlosni režim može koristiti prirodne dane kao kratke dane.

Za planiranje provedbe rasplodivanja tijekom ostalih mjeseci sezone spolne aktivnosti, ovaj se tretman mora provesti korištenjem melatonina za simulaciju kratkih dana. Općenito gledano, ovim protokolom na farmi ostvarujemo pojavu ciklusa 2 puta godišnje s razmakom od 6 mjeseci tj. 2 razdoblja jarenja.

Jasno je da se protokoli koji se izvode tijekom pune sezone mogu izvesti i manipulacijom dvama injekcijama prostaglandina, bez aplikacije svjetlosnih režima.



Slika 3. Provođenje svjetlosnog režima na farmi

Razdoblje dugog dana: Razdoblje dugog dana može se ostvariti umjetnim osvjetljenjem ili korišćenjem prirodnih dugih dana, ovisno o željenom vremenu rasplodivanja i tipu (opremljenosti) uzgoja.

Kod umjetnog osvjetljenja objekt treba biti opremljen neonskim svjetlima koja stvaraju rasvjetljenje od najmanje 200 luksa u razini očiju životinja. Životinje trebaju biti izložene neprekidnom svjetlu tijekom 16 uzastopnih sati na dan (od 6h ujutro do 22h navečer). Osvjetljenje mora početi prije zore i završiti nakon zalaska sunca. Točno vrijeme početka i završetka osvjetljenja (uvijek u ukupnom trajanju od 16h može se pomicati, ali ukupna izloženost mora iznositi 16h). Ukoliko ih izložimo dugom danu koji traje duže od 16h (18h, 20h ili više) inhibitorni učinak svjetla na spolnu aktivnost bit će slabiji.

Ukoliko je u nekim objektima tijekom dana zadovoljavajuća rasvijetljenost (200 lx) tada se i prirodna svjetlost može koristiti kao dio svjetlosnog režima.

Prirodno duge dane možemo u svrhu režima dugog dana koristiti tijekom proljeća i ljeta, pod uvjetom da prije toga nisu bile izložene svjetlosnom režimu umjetnog dugog dana jer previše dugih dana može u koza izazvati neurednu cikličnost.

Uvjeti za provođenje **režima krakog dana** (8h do maksimalno 12h kontinuiranog osvjetljenja) ostvaruju se na dva načina, ovisno o željenom razdoblju provođenja rasplodivanja: korištenjem prirodnih kratkih dana (nakon provedbe režima dugog dana, ukoliko su prirodni dani dovoljno kratki, možemo ih koristiti u sklopu režima kratkog dana) ili aplikacijom subkutanih implantata melatonina. Ako režim kratkog dana započne prije 15. ožujka / 01. travnja, prirodni dani mogu se koristiti kao kratki dani.

Implantate melatonina u načelu koristimo kada režim dugog dana završava kalendarski prekasno te prirodne dane zbog njihove dužine ne možemo smatrati kratkima ili pak kada radni raspored u uzgoju ne omogućuje da životinje budu izložene kontinuiranom mraku u trajanju od barem 12h. Svakoj kozi aplicira se po 1, a svakom jarcu po 3 implantata, prvog dana režima kratkog dana. U uzgojima gdje nije moguće osigurati maksimalno 12h svjetlosti u razdoblju kratkih dana preporuča se korištenje melatoninskih implantata.

Za provođenje rasplodivanja u razdoblju anestrusa koristi se klasični svjetlosni režim koji se sastoji od 90 DD nakon kojih slijedi 60 KD.

Za provođenje rasplodivanja tijekom sezone spolne aktivnosti, za postizanje sinkronizacije spolnog ciklusa, svjetlosni režim treba se sastojati od 90DD+ 90KD+90DD+90KD. Za provedbu rasplodivanja tijekom mjeseca studenog (razdoblje spolne aktivnosti), ovaj svjetlosni režim koristi prirodne dane kao kratke dane.

Za planiranje provedbe rasplodivanja tijekom ostalih mjeseci sezone spolne aktivnosti, ovaj se tretman mora provesti korištenjem melatonina za simulaciju kratkih dana. Ovaj protokol omogućuje dva razdoblja rasplodivanja u šestomjesečnom razdoblju (npr. svibanj i studeni).

FLOCK-REPROD protokoli temelje se na primjeni svjetlosnih režima u kombinaciji s učinkom mužjaka što će u konačnici rezultirati sinkronom pojavom mrkanja u koza. Ovi protokoli alternativa su standardnim gestagenskim protokolima (vaginalne spužvice). Uspjeh ovih protokola zahtijeva striktno pridržavanje uputstvima, a predviđeni su za provođenje UO koza (ili pak pripusta „iz ruke“ i prirodnog pripusta na velikim farmama gdje želimo ostvariti grupirana jarenja), sve bez korištenja hormonskih protokola.

Za provođenje protokola treba koristiti koze (ne šilježice) koje su se jarile prethodne godine (30 - 60 dana prije početka režima dugog dana), u laktaciji, s urednom reproduktivnom anamnezom (bez pobačaja), u dobi od 2 - 6 godina, dobre tjelesne kondicije.

Sva 3 protokola su još u testnoj fazi, kao takvi nevalidirani te ih zbog toga u nastavku teksta ne iznosimo u najsitnije detalje.

Prostaglandinski protokol PG1

Možemo ga koristiti za provedbu rasplodivanja tijekom anestrusa ili prijelaznog razdoblja, a nakon provedbe klasičnog svjetlosnog režima.

Također, može se koristiti tijekom sezone spolne aktivnosti, ali samo nakon provođenja svjetlosnog režima koji se sastoji od izmjene 90DD + 90KD + 90DD + 90KD koji treba započeti provoditi prethodne godine kako bi u vrijeme uvođenja mužjaka ženke bile aciklične. Protokol se sastoji od uvođenja mužjaka opremljenog pregačom koji ženke mora pobuditi i učiniti ih cikličnima, a s kozama ostaje u boksu sve do trenutka osjemenjivanja. Nakon pojave kratkog, neplodnog ciklusa, dolazi do pojave plodnog ciklusa, nakon kojeg na jajniku ostaje funkcionalno žuto tijelo. Aplikaciju prostaglandina (75 µg kloprostenola) provodimo u vrijeme kada funkcionalno žuto tijelo više nije refrakerno te naposljetku provodimo UO u vrijeme pojave estrusa induciranog aplikacijom prostaglandina. Prije uvođenja mužjaka potrebno je ultrazvučno pregledati koze kako bismo isključili pseudogravidne ženke.

Prostaglandinski protokol PG2

Ovaj se protokol može provesti tijekom sezone spolne aktivnosti kada je 90-100 % ženki ciklično, bez potrebe za prethodnim provođenjem svjetlosnog režima.

Protokol se sastoji od utjecaja mužjaka i primjene dvije injekcije prostaglandina aplicirane u razmaku od 9 dana.

Protokol se sastoji od uvođenja mužjaka opremljenog pregačom i istovremene aplikacije prve injekcije prostaglandina (75 µg kloprostenola). Nakon druge aplikacije prostaglandina slijedi UO u induciranom ciklusu. Prije uvođenja mužjaka potrebno je ultrazvučno pregledati koze kako bismo isključili pseudogravidne ženke.

Nehormonalni protokol (hormone free, sans hormone)

Ovaj se protokol može provoditi tijekom anestrusa ili tijekom pune sezone uz prethodno izlaganje životinja svjetlosnom režimu (klasični svjetlosni režim za provođenje tijekom anestrusa, odnosno cjelogodišnji svjetlosni režim 90DD + 90KD + 90DD + 90KD za provođenje tijekom pune rasplodne sezone).

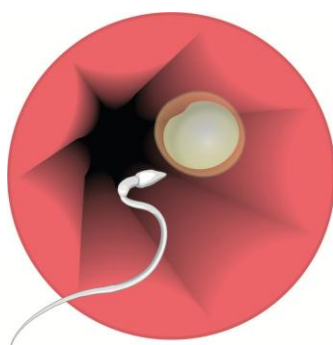
Za ovaj protokol treba isplanirati dvostruki broj ženki koje će ući u protokol od broja ženki koje želimo osjemeniti.

Detekcija estrusa - prilikom provođenja ove metode, mužjaku se na pregaču iza 5. dana mora postaviti marker jer se osjemenjuju samo obilježene koze. Lažno obilježene koze (slabo obilježene dok su bile npr. na hranilištu) se ne broje, niti osjemenjuju. Evidencija obilježenih koza obavlja se dva puta dnevno (npr. tijekom mužnje). Umjetno osjemenjivanje koza obavlja se nakon što broj koza koje su obilježene dosegne 50 % ukupnog broja koza. Ukoliko se prag od 50 % ne dosegne tijekom punih 8 dana, osjemenjuju se obilježene koze u točno određeno vrijeme nakon posljednje detekcije. Osjemenjuju se i koze koje su obilježene u razdoblju između pozitivne tj. posljednje detekcije i vremena osjemenjivanja.

Literatura:

1. *Arendt J. (1998):* Melatonin and pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* 3, 13-22.
2. *Chemineau P. (1987):* Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats. A review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135-147.
3. *Chemineau i sur. (1992):* Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30 (1-3), 157-184.
4. *Chemineau i sur. (1999):* Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 129-142.
5. *Delgado i sur. (2002):* Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780-2786.
6. *Flores i sur. (2000):* Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409-1414.
7. *Grizelj i sur. (2011):* Reproductivni menadžment stada u kozarstvu – kratki pregled. Zbornik predavanja, 107-115. Divčibare, Srbija.
8. *Malpoux i sur. (1999):* Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 355-366.
9. *Soilaiman, Sandra (2010):* Goat Science and Production. Wiley-Blackwell, Ames, SAD.
10. *Smith M. i Sherman D. (2009):* Goat Medicine. Wiley-Blackwell. AMES, SAD.
11. *Pugh D. G. (2002):* Sheep and Goat Medicine. Saunders Philadelphia, SAD.
12. *Walkden-Brown SW i sur. (1999):* Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 243-57.

RADIONICA



CARSKI REZ KRAVA I OVACA

CESAREAN SECTION OF COWS AND SHEEPS

Maletić Milan, Đurić Miloje, Magaš Vladimir

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Kratak sadržaj

Carški rez kod krava i ovaca postala je rutinska porodiljska tehnika sa visokim procentom preživljavanja i majke i ploda (ova). Ovaj zahvat je daleko brži i sigurniji od fetotomije a istovremeno i manje naporan po samu porodilju. Jedan od najznačajnijih koraka u samom izvođenju ove operativne tehnike jeste pravovremena i tačna dijagnoza uzroka teškog porođaja, a sa tim u vezi i blagovremeno započinjanje samog carskog reza. Dobra prognoza nakon završetka carskog reza može se očekivati ukoliko su ispunjeni neki od sledećih uslova: spretnost i brzina samog hirurga, dostupnost spretnih pomagača, odgovarajući ambijent u kom se izvodi sam zahvat, prisutnost odnosno izostanak određenih sistemskih i metaboličkih oboljenja porodilje, telesna kondicija kod krava, vreme od početka samog porođaja koje ne treba da bude predugo, vitalnost ploda(ova), itd. Indikacije za carski rez su višestruke ali, terminološki podelili smo ih u dve velike grupe: apsolutne i relativne. Neke od najvažnijih apsolutnih indikacija su: prevelik plod i narazvijenost karličnih kostiju i duplje, torzija uterusa porodilje, nakaze, atonija uterusa (primarna i sekundarna), nepotpuno otvaranje cerviksa, emfizem ploda, povrede mekog i koštanog dela porođajnog kanala, itd. U relativne indikacije za carski rez spadaju poremećaji habitusa, situsa i pozicije, hidrops plodovih omotača, blizanačka trudnoća, itd. Cilj ovog rada bio je definisanje i prikaz pravilnog pristupa i tehnike izvođenja carskog reza kod krava i ovaca sa posebnim osvrtom na poštovanje pravila asepsa i antisepsa i na kvalitetan i potpun postoperativan tretman.

Ključne reči: krave, ovce, carski rez.

Summary

Caesarean section in cows and sheep became routine obstetric techniques with a high percentage of survival of both mother and fetus (s). This procedure is much faster and safer than fetotomia while less strenuous on the very travail. One of the most important steps in the performance of this surgical technique is timely and accurate diagnosis of the cause of severe birth, and in that respect, and timely

initiation of the c-section. Good prognosis after cesarean delivery can be expected if they met any of the following conditions: speed and dexterity of the surgeon, the availability of skilled facilitators, appropriate environment in which I performed surgery, the presence or absence of certain systemic and metabolic diseases mothers, body condition of cows the time from the beginning of the birth, which should not be too long, the vitality of the fetus (s), etc.. The indications for cesarean section are Multi-link but we terminology divided them into two groups: absolute and relative. Some of the most important indication of the absolute torsion of the uterus mothers, monsters, uterine atony (primary and secondary), incomplete opening of the cervix, fetal emphysema, injury of soft and bone birth canal part, etc.. The relative indications for cesarean section are disorders of habit, situs and position, fetal hydrops layer, twin pregnancy, and so on. The aim of this study was to define and display the correct approach and techniques of cesarean sections in cows and sheep, with particular emphasis on respect for the rules of asepsis and antisepsis and the prompt and complete the post-operative treatment.

Key words: cows, sheeps, caesarean section.

Carski rez predstavlja široko primenjenu metodu dovršetka teškog porođaja koja se sve više primenjuje u rutinskom radu veterinara na terenu. Prednost ove metode ogleda se u velikom procentu preživljavanja majke i ploda tj. plodova. Takođe, nakon izvođenja carskog reza porodilje u visokom procentu ostaju reproduktivno sposobne. Uspešnost ove metode zavisi od nekoliko faktora: veština i brzina akušera-hirurga, dužina trajanja porođaja, prisustva iskusnog asistenta, uslova u kojima se sprovodi hirurški zahvat. Težak porođaj (distokija- *Partus gravis*) nastaje iz više razloga. Uzroci koji dovode do distokije se uglavnom i poklapaju sa razlozima tj. indikacijama za izvođenje carskog reza na porodilji. Delimo ih na: uzroke poreklom od majke, uzroke poreklom od ploda i uzroke poreklom od plodovih ovoja.

Uzroci poreklom od majke: vezani za kontraktilne sile koje dovode do ekspulzije ploda u spoljašnju sredinu (tzv. ekspulzivni defekti), odnosno uzroci vezani za porođajni kanal. Primarna i sekundarna atonija uterusa su dosta česti uzroci teškog porođaja. Primarna atonija se javlja usled poremećaja u miometriju, može biti prouzrokovana: preteranim istezanjem zida materice, toksičnom degeneracijom, masnom infiltracijom, starošću same porodilje, nutritivnom deficijencijom, ukoliko postoji neko sistemsko oboljenje, a može biti i naslednog karaktera. Pod pojmom sekundarne atonije uterusa, smatra se da su kontrakcije uterusa postojale, ali su nakon izvesnog vremena prestale usled zamaranja miometrijuma. Hernijacija gravidnog uterusa, ruptura dijafragme, perforacija traheje su razlozi koji mogu dovesti do nastanka abdominalnih ekspulzivnih defekata vezanih za trbušnu presu. Uzroci distokije vezani za porođajni kanal dele na uzroke poreklom od karlice- tj. koštanog dela porođajnog

kanala: nedovoljna razvijenost karlice, frakture, vrsta odnosno rasa životinje (pelvimetrijski parametri), neoplazme ili druga oboljenja. Kada je reč o mekotiivnim delovima porođajnog kanala: uterus, cerviks, vagina i vulva, do distokije najčešće dolazi usled nedovoljne dilatacije istih, ali postoje i brojni drugi razlozi: torzija uterusa, fibroza ili atonija cerviksa, kongenitalni defekti, neoplazme, ciste, abscesi, prolapsus vagine, nedovoljna razvijenost ili nemogućnost dilatacije vulve.

Uzroci vezani za plod se najčešće odnose na veličinu i/ili pogrešnu dispoziciju fetusa. Veličinu fetusa klasifikujemo kao apsolutnu i relativnu. Apsolutno veliki plod je onaj koji je veliki za svaku majku, bez obzira na povoljne pelvimetrijske parametre i dovoljnu dilatiranost tvrdih i mekih delova porođajnog kanala, plod je preveliki da bi *per via naturales* bio istisnut u spoljašnju sredinu. Relativno veliki plod je plod normalne veličine, ali je porođajni kanal nedovoljno prostran za ekspulziju ploda *per vaginam*.

Situs, pozicija i habitus su tri osnovna parametra kojima opisujemo intrauterini položaj ploda, od njih umnogome zavisi tok porođaja.

Situs ili položaj predstavlja odnos podužne ose ploda u odnosu na podužnu ili longitudinalnu osu majke. Pravilan situs je podužni (longitudinalni). Nepravilni oblici situsa su:

- poprečni (transverzalni)
- okomiti (vertikalni)
- trbušni ili leđni u zavisnosti kojim delom tela je plod okrenut ka porođajnom kanalu.

Pozicija ili smeštaj predstavlja odnos leđa ploda prema leđima majke. Pravilna pozicija je gornja, kada su leđa ploda okrenuta ka leđima majke, nepravilna pozicija može biti:

- donja
- bočna.

Habitus predstavlja odnos pokretnih delova ploda (ekstremiteta i glave) u odnosu na trup ploda. Pravilan habitus pri porođaju bi trebalo da bude takav da su svi ekstremiteti i glava ispruženi tako da ne dođe do eventualnog zaglavljivanja u porođajnom kanalu. Postoje poremećaji habitusa prednjih, zadnjih ekstremiteta i poremećaj habitusa glave. U poremećaje habitusa prednjih ekstremiteta spadaju:

- *flexio phalangae primae, flexi carpi, flexio scapulohumeralis, flexio scapulohumeralis et. cubiti, decusatio*

Kada je reč o poremećajima habitusa zadnjih ekstremiteta tu spadaju:

- *flexio phalangae primae, flexio tarsi, flexio coxalis*

U poremećaje habitusa glave spadaju:

- *lateroflexio, ventroflexio, retroflexio, torsio capitis et. cervicis*

Poremećaji situsa, pozicije i habitusa kao i veličina ploda predstavljaju najčešće uzroke teškog porođaja kod velikih životinja. U smislu težine poremećaja intrauterinih parametara ploda, najteže poremećaje predstavlja poremećaj situsa, u ovom slučaju dolazi do promene pravca kretanja ploda, pa je zbog toga najteže izvršiti korekciju, a potom i ekstrakciju ploda u spoljašnju sredinu.

Kada je reč o teškom porođaju kod krava, najčešće su prisutni razlozi poreklom od ploda: poremećaj situsa, pozicije i naročito habitusa, mrtav plod, nakaze (*shcistosoma reflexus*, *perosomus elumbis*-najčešće). Nedovoljna dilatiranost cerviksa, kao i kaudalnih partija vagine i vulve (naročito kod debelih junica), atonija uterusa, udružena sa hipokalcemijom, i torzija uterusa su najzastupljeniji uzroci distokije poreklom od majke. Blizanačka trudnoća kod krava može biti i normalan porođaj uz pomoć veterinara.

Kod ovaca i koza najčešći uzrok distokije, bez obzira na rasu je fetopelvisna disproporcija. Češće se javlja kod primipara, i ako su donešena muška jagnjad ili jarad, koja su po pravilu krupnija od ženki. Pored fetopelvisne disproporcije nepravilni habitusi su čest uzrok distokije. Blizanačka trudnoća kod ovaca i koza ne predstavlja problem, izuzev u slučaju kada dođe do istovremenog ulaska plodova i njihovog zaglavljivanja u porođajnom kanalu.

Carski rez

Osnovna podela metoda dovršetka porođaja jeste na krvne i beskrvne metode. U krvne metode spadaju **carski rez** i perkutana fetotomija, a u beskrvne: ekstrakcija, ekstrakcija *per fors*, korekcija i ekstrakcija, i subkutana fetotomija.

U slučaju teških poremećaja situsa, pozicije, apsolutne fetomaternalne disproporcije, torzije, hernije, rupture ili atonije gravidnog uterusa. Kod domaćih životinja carski rez često predstavlja jedini mogući metod dovršetka teškog porođaja. Indikacije za carski rez delimo na apsolutne i relativne. U apsolutne spadaju: apsolutno veliki plod, torzija uterusa i nemogućnost retorzije, uska karlica, nedovoljno otvoren ili zatvoren cerviks, nemogućnost izvršenja fetotomije, prolapsus vagine, ruptura vagine i uterusa, primarna ili sekundarna atonija, spastične kontrakcije uterusa. Relativne indikacije za carski rez su: poremećaj situsa, pozicije i ređe habitusa, nakaze, hidrops plodovih ovojnica, mrtav i emfizematozni fetus, blizanačka trudnoća. Carski rez kao metodu delimo na: *Sectio cesarea conservativa (laparotomia i hysteretomia)*, *Sectio cesarea radicalis (hysterectomy)*, *Sectio cesarea in moribunda sive ante mortem* (operacija na životinji koja uginjava)-u cilju spašavanja ploda.

Priprema za samu operaciju je od vitalnog značaja za povoljan ishod. Pravilna premedikacija, fiksiranje porodilje, aplikacija trankvilajzera, analgetika, i anestetika. Sedaciju kod krava, i drugih preživara obično sprovodimo 2% ksilazinom u dozi od 0.05-0.1mg/kg (maksimalno 20-40mg tj.1-2 ml po kravi).

Porodilja tokom operacije može biti u stojećem ili ležećem položaju, što zavisi od njenog opšteg stanja, odluke akušera-hirurga i uslova u objektu ili „livadi“ gde izvodimo zahvat. Za izvođenje uspešne operacije obično su potrebna minimum dva asistenta: jedan da pomogne u fiksiranju porodilje, drugi u izvlačenju ploda i dodavanju instrumenata akušeru. Iskustvo akušera i asistenata je bitan faktor od koga umnogome zavisi tok operacije. Idealna situacija za izvođenje carskog reza bila bi postojanje čistog i prostranog boksa u kom imamo dostupnu vodu, dobro osvetljenje, kao i dovoljne količine čiste prostirke, ali to često nije luksuz koji nam je na terenu dostupan.

Anestezija; izbor anestezije zavisi od hirurga i mesta incizije. Osnovni rezovi koje koristimo pri izvođenju carskog reza krava i ovaca su bočni (vertikalni, kosi ili parakostalni) i paramedijalni-ventrolateralni rez. Kod oba pristupa mogu se koristiti sledeći tipovi anestezije. Paravertebralna anestezija koja se aplikuje između transverzalnih nastavaka T13 i L1, L1 i L2, L2 i L3 pršljena. U svaki međupršljenski prostor se aplikuje po 20ml 2% lokalnog anestetika (lidokain, prokain) 12-14ml za blokiranje ventralnih nervnih ogranaka, 6-8ml za blokiranje dorzalnih nervnih ogranaka. Anestezija u vidu invertnog L bloka je takođe pogodna, 2% lokalni anestetik se aplikuje na više mesta, broj mesta aplikacije zavisi od orijentacione dužine reza koji ćemo postaviti. U svaku tačku aplikujemo minimum po 15ml anestetika. Tehnika aplikacije „invertni L blok“ anestezije je jednostavna i pouzdana, jedini nedostatak može biti lošija anestezija parijetalnog peritoneuma pa može doći do reakcije prilikom incizije. Takođe ovaj vid anestezije može biti manje pouzdan kod debelih jedinki. Epiduralna anestezija takođe daje dobre rezultate, i solidnu anesteziju na boku, međutim može dovesti do ataksije zadnjeg dela tela i onemogućiti brzo ustajanje porodilje. Kod infiltrativne anestezije, lokalni anestetik se aplikuje po liniji reza u dužini od 30 do 40cm, 80 do 100ml 2% lokalnog anestetika što je dovoljno da obezbedi solidan nivo anestezije i analgezije prilikom izvođenja reza. Nedostatak infiltrativne anestezije predstavlja edemiziranje tkiva pošto lokalni anestetik aplikujemo po liniji reza, što nije slučaj kod prethodno navedenih tipova anestezije. U obzir dolaze i kombinacije različitih tipova anestezije, npr. paravertebralna u kombinaciji sa infiltrativnom, ili epiduralne i invertni L blok anestezije.

Preoperativna priprema; Operaciono polje mora biti što bolje pripremljeno. Pre šišanja i/ili brijanja pre svega moramo očistiti porodilju od prljavštine. Dezinfekciju sprovodimo alkoholom i povidon-jod penom, povidon jodom ili rastvorom hlorheksidin-glukonata. Bilo bi poželjno da se operaciono polje prekrije sterilnom kompresom, ili „buster up“ folijom. Akušer takođe treba da se pripremi za operaciju, što podrazumeva temeljno pranje i dezinfekciju ruku, kao i upotrebu hirurških rukavica.

Preoperativna aplikacija antibiotika je preporučljiva u cilju sprečavanja potencijalnih infekcija, pogotovo ako se u obzir uzmu uslovi u kojima se operacija

na terenu najčešće izvodi. Najčešće se koristi kombinacija prokain-penicilina i dihidrostreptomocina u dozi od 10mg/kg. Tokolitički agensi poput β -adrenergičkog agonista klenbuterola, ili denaverin-hidrohlorida aplikovani intramuskularno smanjuju tonus glatke muskulature i obezbeđuju lakšu eksteriorizaciju gravidnog uterusa, takođe oni pojačavaju efekat ksilazina kao miorelaksansa. Pre postavljanja reza treba proveriti da li anestezija dovoljno dobra, mišići i peritoneum mogu ostati senzitivni bez obzira na gubitak bola u koži. Incizija na boku leve strane se najčešće upotrebljava kod stojeće porodilje, hirurg treba da proceni da li će životinja izdržati operaciju u stojećem položaju ili treba izvesti obaranje pre početka intervencije. Pristup sa leve strane je dobar zbog toga: što burag sprečava ekspoziciju creva i na taj način olakšava rad, izuzev u slučajevima uvećanog buraga kada može ometati ulazak u abdomen i pristup materici. Korekcija torzije materice je lakša ukoliko postavimo ovaj rez, takođe ukoliko dođe do dehiscencije rane njen tretman je lakši kod ovog nego kod rezova koji se postavljaju niže. Bočni rez sa leve strane može biti: vertikalni, kosi i ventrolateralni (niski rez sa leve strane) rez. Kosi rez ima sledeće prednosti: abdominalni mišići se lepše seku (što kasnije omogućava i bolje zatvaranje-šivenje rane), bolji pristup genitalnom traktu, a nedostaci su: moguće presecanje *a. iliace circumflexae* (ako rez produžimo kaudo-dorzalno), ili lošija anestezija (ako rez produžimo kranio-ventralno).

Ventrolateralni rez ima sledeće prednosti: dobra ekspozicija uterusa čak i kada je trošan, i sklon pucanju, manja mogućnost izlivanja sadržaja uterusa u trbušnu duplju. Teže zatvaranje, veća tenzija rubova rane i usecanje konaca u tkivo su nedostaci ovog reza.

Medijalni i paramedijalni rez se ne upotrebljavaju često na terenu pošto je za izvođenje operacije sa ovakvim pristupom potrebna ozbiljnija sedacija i anestezija, takođe vrlo često respiratorna funkcija ploda je kompromitovana. Pristup sa desne strane porodilje je neuobičajen, ali indikovano ukoliko postoje adhezije sa leve strane nastale kao rezultat neke prethodne operacije. Pristup uterusu kod desnostranog zahvata je dobar, tanka creva mogu ometati izvođenje operacije (nema buraga da ih zadrži) .

Pri izvođenju carskog reza sa leve strane seku se sledeće strukture: koža, *m.obliquus externus*, *m.obliquus internus*, *m.transversus abdominis*, peritoneum. Pri sečenju peritoneuma treba voditi računa da se ne iseče zid buraga koji se nalazi na liniji reza. Eventualna krvarenja pri inciziji mišićnih slojeva obično nisu previše jaka i mogu se zaustaviti postavljanjem hemostatskih hvataljki, a ukoliko je potrebno presečeni krvni sud se mora ligirati. Nakon otvaranja peritoneuma i ulaska u abdominalnu duplju nekad su odmah uočljive veće količine peritonealne tečnosti ponekad sa primesama krvi, ovakva stanja se najčešće javljaju usled: prolongirane distokije, infekcije materice, torzije i rupture materice. U slučaju torzije ili infekcije uterusa takođe su prisutne i veće količine fibrina u trbušnoj duplji.

Nakon otvaranja abdomena akušer treba rukom da eksploriše abdominalnu šupljinu i proveri položaj fetusa. Nakon toga sledi fizički jako zahtevan deo operacije koji podrazumeva eksteriorizaciju (navlačenje) gravidnog uterusa do ivica rane. Ovaj zahvat sprovodimo da bi prilikom otvaranja gravidnog roga sprečili isticanje plodovih voda u abdomen. Manipulacija uterusom izaziva istežanje mesometrium-a i može izazvati bol kod porodilje.

Zid materice se seče oprezno, treba voditi računa da se ne povrede karunkuli. Orijehtir prilikom incizije su duge cevaste kosti, najbolje bi bilo postaviti inicijalni rez skalpelom, a zatim nakon provere endometrijuma prstom, proširiti ga makazama. Rez na uterusu treba da bude izdašan, jer ukoliko je prekratak prilikom ekstrakcije ploda iz materice može doći do njenog nekontrolisanog cepanja što kasnije značajno otežava šivenje. Alantohorion i amnion se probijaju rukom i plod se izvlači u spoljašnju sredinu pomoću porodiljskih užadi ili lanaca. Živ plod se odmah predaje asistentu, dok akušer nakon izvlačenja ploda treba da proveri uterus još jednom, na prisustvo još jednog ploda, kao i eventualnih povreda tj. laceracija uterusa koje treba ušiti. Posteljica se izvlači lagano, bez upotrebe preterane sile. Pre početka šivenja rubove rane na uterusu treba još jednom proveriti, ako je prisutno krvarenje iz nekog većeg krvnog suda isti treba podvezati i na taj način zaustaviti krvarenje. Inciziju na uterusu šijemo od kraja koji je bliži cerviksu. Način šivenja uterusa se razlikuju ali je princip isti, šije se „seroza na serozu“, u pitanju su invertirajući šavovi: Lembertov, Kušingov, modifikovani Kušing tzv. Utreht šav. Prilikom šivenja treba voditi računa da igla i konac ne prolaze u lumen uterusa. Nakon što je uterus zašiven treba ga obrisati sterilnom gazom i isprati Hartmanovim rastvorom. Može se aplikovati oksitocin 20-40i.j. intramuskularno u cilju poboljšanja involucije uterusa. Neki autori preporučuju aplikaciju vodenih rastvora antibiotika u trbušnu duplju, kristalni penicilin npr.. Rez na boku porodilje šijemo u tri etaže: peritoneum sa *m.transversus*, zatim *m.obliquus internus* i na kraju *m.obliquus externus abdominis*. Kožu šijemo pojedinačnim čvorastim šavom, „U“ šavom, ili tekućim blokirajućim šavom. Postoperativna nega porodilje podrazumeva aplikaciju antibiotika u periodu od 3-5 dana, oksitocina 20-40i.j., kalcijum-boroglukonata kod visoko mlečnih krava, a u cilju sprečavanja hipokalcemije i ubrzavanja involucije materice. Nesteroidni antiinflamatorni preparati treba da se aplikuju jedinkama koje su imale teži oblik distokije, torziju uterusa ili infekciju uterusa. Intravenska nadoknada tečnosti je takođe indikovana pogotovo ukoliko postoje simptomi šoka. Porodilju treba pregledati 24-48h nakon operacije: izmeriti telesnu temperaturu, videti kakav je apetit i konzistencija fecesa, ako je došlo do retencije posteljice treba sprovesti odgovarajuću terapiju. Konci sa kože se uklanjaju 2-3 nedelje nakon operacije, ovom prilikom treba ponovo pregledati genitalni trakt, pošto se endometritisi češće javljaju nakon carskog reza. Moguće komplikacije nakon izvođenja carskog reza su sledeće: peritonitis, dehiscencija rane, krvarenja, metritis, retencija

posteljice, subkutani emfizemi, frakture itd.. Eventualnu inseminaciju jedinke ne bi trebalo raditi do 60 dana *post partum*.

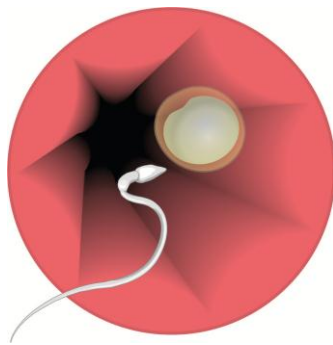
Najčešće indikacije za izvođenje carskog reza kod ovaca su: nedovoljna dilatiranost cerviksa, prolapsus vagine, fetopelvisna disproporcija, naročito kod primipara sa jednim plodom, fetalni emfizem nakon prolongirane distokije. Nešto ređe indikacije su: poremećaji situsa, pozicije ili habitusa, torzija uterusa.

Anestetički protokol je dosta sličan kao kod krava. Koriste se paravertebralna, invertni „L“ blok i lokalna infiltrativna anestezija. Pri aplikaciji anestetika treba voditi računa pošto je trbušni zid kod ovaca mnogo tanji, da ne dođe do eventualne penetracije u creva. Operativna tehnika je ista kao i kod krava. Uglavnom postavljamo bočni vertikalni ili kosi rez. Kao i kod aplikacije anestetika, prilikom postavljanja reza moramo biti oprezni i voditi računa da slučajno ne isečemo burag. Incizija na uterusu se takođe postavlja pažljivo zbog prisustva karunkula. Pre zašivanja uterus treba proveriti na eventualno prisustvo još nekog ploda. Tehnika šivenja uterusa i abdominalnog zida ista je kao i kod krava. Podaci o reproduktivnom statusu ovaca nakon izvođenja carskog reza su siromašni, možda iz tog razloga što se ovce nakon izvođenja carskog reza dosta često isključuju iz priploda.

Literatura:

1. *Jackson, P.G.G.* (1996) In: Handbook of Veterinary Obstetrics. London: W.B. Saunders
2. *Vandeplassche, M.* (1980): Obstetrician's view of the physiology of equine parturition and dystocia. *Equine Vet J* 1980; 12:45-49.
3. *Roberts, S.J.* (1972): Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. Woodstock, VT: Roberts
4. *Arthur G.H.*: Recent advances in bovine obstetrics. *Vet Rec* 1966; 79:630
5. *Sloss V.*: A clinical study of dystocia in cattle. 1. Treatment. *Austr. Vet. J.* 1974: 50:290
6. *Arthur, G.H.; Noakes, D.E.; Pearson H.*: Veterinary reproduction and obstetrics; Elsevier Limited 2001.
7. *Robert S. Youngquist; Walter R. Threlfall*: Current Therapy in Large Animal Theriogenology Vol.2; Elsevier Inc. 2007.

KRATKA SAOPŠTENJA I POSTERI



**ZAVRŠETAK ANTIBIOTSKE ERE U LIJEČENJU
Staphylococcus aureus MASTITISA U KRAVA**

**END OF ANTIBIOTIC ERA IN THE TREATMENT OF
Staphylococcus aureus MASTITIS IN COW**

Gereš Darko, Špoljarić Branimira

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Kratak sadržaj

Staphylococcus aureus mastitis nemoguće je kontrolirati: antibiotici penetriraju deficijentno, a uzročnik živi izvan leukocita i inaktivira antibiotike. Uzročnik je kontagiozan, a od izbijanja infekcije, mastitisi uglavnom nisu kurabilni. Perspektiva eradikacije je lizostafin, anti-stafilokokni agens, mješavina proteolitičkih antimikrobnih enzima porijeklom od stafilolitičkih stafilokoka. Dio gena *Staphylococcus simulans* kloniran je u citoplazmu *E. coli* koja imunizira alveolarni epitel za produkciju lizostafina, koji uništava ekstracelularni matriks *Staphylococcus aureus*-a prije ozljeđivanja i kolonizacije epitela, čime je preveniran upalni odgovor. Genetičkim inženjeringom sintetizirana je transgenička krava koja secernira lizostafin u vlastito mlijeko. *Staphylococcus aureus* producira adhezivne matriks molekule (MSCRAMMs). Adhezijski faktor fibronektin, arteficialno primijenjen, veže se uz MSCRAMMs, blokirajući adheziju *Staphylococcus aureus*-a za mamarni epitel. Imunizacijom krava antimatriks antigenom, bakterija bi postala neškodljiva?

Ključne riječi: *Staphylococcus aureus* mastitis, mliječne krave, neantibiotska terapija.

Uvod

Mastitis mliječnih krava uzrokovan *S. aureus* bakterijom svjetski je problem. U svijetu je inficirano 40-50% krava (prosječno dvije četvrti). Prosječni godišnji gubitak po kravi je 200 \$ zbog vidljivog i prikriivenog pada mliječnosti, troškova liječenja, odbačenog mlijeka (70%), smanjene kvalitete mlijeka, uginuća i izlučenja. Mogući su letalni gangrenozni mastitisi, ali u 80% slučajeva su subklinički. U njih se sporadično javljaju snažne kliničke epizode, naročito nakon telenja. Subkliničke forme teško je detektirati budući da nema poremećaja općeg stanja, u mlijeku nema promjena kao ni uočljivih promjena na četvrti, ali je (ne uvijek) povišen broj somatskih stanica. Inficirano je 68% netretiranih zasušenih

krava u kojih će infekcija buknuti u sljedećoj laktaciji. Nove infekcije se javljaju u 26% četvrti. Glavni izvor su inficirane četvrti, sisni kanal, ozljede sise, ali budući da se radi o bakterijama iz okoliša, one su svugdje pristne (na koži sise, njušci, nosnicama, stidnici), odakle se šire sisaljka, rukama muža, odjećom i muhamama. Jedanput kada nastane infekcija, *S. aureus* u pravilu (u laktaciji) ne reagira na antibiotsku terapiju, pa inficirane krave treba izlučiti ili eventualno odvojiti od stada. U nekim stadima sa SCC ispod 200,000, farmeri ne mogu eradikirati *S. aureus*, tim više što je u 40% slučajeva nedetektabilan.

S. aureus producira toksine destrukcije stanične membrane epitela alveola (hemolizine, leukotoksin, leukocidin) i prodire u kanalikularni sustav gdje stvara ozljede. Ožiljkasto tkivo je propusno za toksine, koji uzrokuju jaku deskvamaciju i stvaranje apscesa. Iz novih ožiljaka opet se formiraju sve veći apscesi i novi ožiljci. U konačnici preostaje ožiljkasto veliko tkivo (kontraktilna fibroza) tj. atrofija žlijezde i gubitak mlijeka.

Upravo zbog opisanih promjena *S. aureus* mastitise je teško (u laktaciji gotovo nemoguće) liječiti antibioticima jer antibiotik ne penetrira u apscese i ožiljke. Uz to uzročnik je leukotoksičan pa u kolonijama živi izvan fagocita, a i proizvodi penicilinazu.

S. aureus fakultativni je anaerob, G+ kokus koji se javlja u formi grozdolikih klastera čineći zlatnožute hemolitičke kolonije. On je katalaza pozitivan (producira enzim katalazu) koja omogućuje prijetvor hidrogen peroksida (H_2O_2) u vodu i kisik, (po čemu se razlikuje od enterokoka i streptokoka i većine ostalih stafilokoka) i uzrokuje stvaranje slobodnih radikala blokirajući obrambenu sposobnost fagocita. *S. aureus* uzrokuje infekciju kod sitnih lezija kože i sluznica odakle se širi zahvaljujući hijaluronidazi koja razara tkiva. Njegova velika polisaharidna kapsula (biofilm) štiti uzročnika od imunološkog sustava. Proizvodi protein A vezan uz IgG antitijela, što mu omogućava preživljavanje. Sadrži snažne faktore virulencije poput tri skupine toksina. Neki sojevi produciraju karotenoide pigmente djelovanja poput virusa, antioksidantnog učinka, što bakteriju čini otpornom na utjecaj reaktivnog oksigena imunološkog sustava.

Rezistencija na penicilin (koji je temelj terapije) uvjetovana je produkcijom penicilinaze (beta laktamaze) enzima koji razara beta-laktamski prsten molekule penicilina.

Intenzivno se promišljaju novi načini liječenja, u kojem neće biti antibiotika. Tome valja dodati i sve snažnije pritiske zbog škodljivosti antibiotika za ljude. Godine 2012. FDA (Uprava za lijekove i hranu SAD) donijela odluku o zabrani korištenja svih cefalosporina izuzev cepharina (Metrijet) za goveda, svinje, kokoši i purane zbog zaštite zdravlja ljudi, odnosno zbog rezistencije glavnih patogenih bakterija na cefalosporine.

Konačno, poseban problem su MRSA hospitalne infekcije u ljudi. U krava se sve češće nalaze u brisevima i veliko je pitanje što će biti ukoliko se MRSA

proširi kao uzročnik mastitisa (ili sastojak mlijeka). Za sada se koriste penicilinaza rezistentni penicilini, ali i u novih generacija tih antibiotika sve je više rezistencije (Jones i sur.,1998; Zadoks i sur., 2001; Barkema i sur., 2006; Moon i sur., 2007; Sakoulas i Moellering 2008).

Antibiotska terapija sigurno nije budućnost suzbijanja mastitisa jer *S. aureus* je kontagiozni i okolišni uzročnik i kao takav neuništiv izvor zaraze (u kravi, na kravi i oko krave). Demoralizirajuće je što od izbijanja (nakon latencije), više nisu kurabilni. Stoga valja razmisliti o novim načinima liječenja bez antibiotika.

Lizostafin

Wall i sur.(1997) istraživali su mogućnost jačanja otpornosti mliječne žlijezde poticanjem sekrecije antibakterijskog proteina lizostafina, enzima specifičnog afiniteta prema staničnoj membrani *S. aureus*-a. Lizostafin je mješavina tri proteolitička antimikrobna enzima, od kojih dva, hidroliziranjem glicilglicinskih veza u poliglicinskim mostovima što formiraju križne veze među glikopeptidnim lancima u pentaglikanskoj stijenci razgrađuju pentaglikansku staničnu stijenkku *S. aureusa*. Upravo prisutstvo glicina čini tu stijenkku osjetljivom na *S. aureus*. Producira ga stafilolitički *Staphylococcus simulans*, ekstremno snažan antistafilokokni agens koji ubija *S. aureus* unutar minute, uništavajući matriks biofilma. Transgenezom može se zaštititi mliječna žlijezda koja secernira antibiotik bakterijskog podrijetla (bakteriocin) u vlastito mlijeko. Istraživanje je inspirirano inicijalnim istraživanjima transgeneze u miša. Dio gena *S. simulans* (sa lizostafinom) kloniran je u citoplazmu benignog soja *E. coli*.

Prvotno je genetičkim inženjeringom stvorena krava kao bioreaktor za produkciju velikog broja proteina. Transgenezom je stvorena krava koja se imunizira bakterijom *E. coli* kako bi secernirala lizostafin direktno u vlastito mlijeko. U takvom vimenu stafilokoki bivaju eradikirani prije nego uspiju uzrokovati upalu. Pri najvišim razinama lizostafina, stafilokoki se ne bi smjeli više „oporaviti“. Ideja je, uništiti bakterije prije aktivacije imunskog sustava. Lizostafin može biti sintetiziran u eukariotskom sustavu, aktivan je u mliječnoj žlijezdi, a postoje i vektori za ciljnu ekspresiju u samoj mliječnoj žlijezdi, što transgensku kontrolu stafilokoknog mastitisa čini izvodljivom (Recsei i sur., 1987; Oldham i Daley 1991; Wall RJ, 1996; Wall i sur., 1997; Shrinivasan i sur., 2002; Kerr i Wellnitz 2003; Grundling i Schneewind 2006; Kun i sur., 2007; Kumar 2008).

Ranaleksin

Znanstvenici su otkrili mogući način suzbijanja MRSA. Iz kože američke bikovske žabe izoliran je antimikrobni peptid ranaleksin (*Rana catesbeiana* (grč.rana= žaba; alexo = obraniti). Riječ je o kationskom peptidu od 20 aminokiselina, koji proizvode sva živa bića kao obranu protiv patogenih

uzročnika bolesti. On je antimikroban, protuupalan i antitoksičan. Antimikrobni mu je spektar širok, naglašeno za Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Svakako je važan u anticipaciji buduće etiološke predomincije MRSA mastitisa. Naime, MRSA je potencijalna opasnost za vime (uostalom već su opisani slučajevi prijenosa sa mužača na krave). Učinkovit je u kombinaciji sa antibioticima i/ili lizostafinom pa bi se time mogli impregnirati zavoji za inficirane rane (Graham i Coote 2007; Desbois i sur., 2010).

Matriks molekula

Glavni faktor patogenosti *S. aureusa* (zaštićenog biofilmom) je sposobnost da kolonizira parenhim žlijezde i u njemu stvori mikroapsese te se tako odupre obrani domaćina. Priljublivanje uz stanicu sekrecijskog epitela odvija se zahvaljujući adhezijskim matriks molekulama iz obitelji MSCRAMMs. One imaju afinitet prema fibronektinu krvne plazme. Ideja je da se egzogeno aplicirani artefijalni fibronektin kao anti-matriks antigen (DNA vakcina koja sadrži dijelove odgovorne za FnBP i Clumping factor A iz porodice MSCRAMMs odgovorna za imunizaciju, stvaranje antitijela organizma protiv *S. aureus-a*) veže uz matriks molekule *S. aureus-a* i na taj način blokira njegovo priljublivanje za sekrecijski epitel, čime bi se postiglo da *S. aureus* postane bezopasan (Mamo i sur., 1994, Deivanayagam i sur., 2002; Shkreta i sur., 2004).

Stafiloksanin

Karotenoidni pigment stafiloksanin virulentni je faktor odgovoran za zlatnožutu boju *S. aureus-a*. On je antioksidant koji brojnim dvostrukim konjugiranim vezama omogućava „izbjegavanje“ razornog djelovanja reaktivnog kisika imunskog sustava jednog od brojnih načina na koji fagociti eliminiraju patogene bakterije, sa posljedičnim stvaranjem slobodnih radikala. To je jedan od čimbenika koji omogućuju *S. aureus-u* da preživi napade obrambenog sustava organizma.

Blokadom dehidroskvalen oksidaze u prvoj fazi sinteze stafiloksantina koči se i sinteza stafiloksantina. Možda je proizvodnja inhibitora produkcije stafiloksantina budućnost terapije jer u bakterija sa poremećenom produkcijom pigmenta uzrokuju povećanu osjetljivost bakterije.

Prva faza sinteze stafiloksantina ekvivalentna je sintezi kolesterola, pa bi sličnost koristila u terapiji. Inhibicijom sinteze kolesterola u ljudi već se uspjelo inhibirati sinteza stafiloksantina (Liu i sur., 2005; Mijts i sur., 2005; Clauditz i sur., 2006; Liu i sur., 2008).

Literatura:

1. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN, 2006, Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis, *Journal of Dairy Science*, 89, (6),1877–95.
2. Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F, 2006, Staphyloxantin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress, *Infect Immun*, 74, 4950-3.
3. Deivanayagam CCS, Wann ER, Chen W, Carson M, Rajashankar KR, Hoek M, Narayana SVL, 2002, A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A, *The EMBO Journal*, 21 (24),6660-72.
4. Desbois AP, Lang S, Gemmell CG, Coote PJ, 2010, Surface disinfection properties of the combination of an antimicrobial peptide, ranalexin, with an endopeptidase, lysostaphin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *J Appl Microbiol*, 108(2),723-30
5. Graham S, Coote PJ, 2007, Potent, synergistic inhibition of *Staphylococcus aureus* upon exposure to a combination of the endopeptidase lysostaphin and the cationic peptide ranalexin, *J Antimicrob Chemother*, 59, 759-62.
6. Grundling A, Schneewind O, 2006, Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188, 2463–2472.
7. Jones GM, Bailey TL, Roberson JR, 1998, *Staphylococcus Aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control, *Virginia Polytechnic Institute and State University*.
8. Kerr DE, Wellnitz O, 2003, Mammary expression of new genes to combat mastitis, *J Anim Sci*,81,38-47.
9. Kumar JK, 2008, Lysostaphin: an antistaphylococcal agent, *Appl Microbiol Biotechnol* 80(4), 555-61.
10. Kun K, Chanturiya T, Mond JJ, 2007, Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 1051–9.
11. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V, 2005, *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *J Exp Med* , 202 (2), 209-15.
12. Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E, 2008, A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence, *Science*, 319 (5868), 391-4.

13. Mamo W, Jonsson P, Flock J-I, Lindberg M, Müller H-P, Wadström T, Nelson L, 1994, Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*, *Vaccine*, 12, (11), 988-92
14. Mijts BN, Lee PC, Schmidt-Dannert C, 2005, Identification of a carotenoid oxygenase synthesizing acyclic xanthophylls: combinatorial biosynthesis and directed evolution“. *Chem. Biol*, 12, 453-60.
15. Moon JS, Lee AR, Kang MH, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC, 2007, Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant, *J. Dairy Sci*, 90, 1176-85.
16. Oldham ER, Daley MJ, 1991, Lysostaphin: Use of a Recombinant Bactericidal Enzyme as a Mastitis Therapeutic, *J Dairy Sci* 74, 4175-82.
17. Recsei PA, Gruss AD, Novick RP, 1987, Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 84, 1127-31.
18. Sakoulas G, Moellering RC, Jr, 2008, Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Clin Infect Dis*, 46 (5), 360-7.
19. Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P, 2004, Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows, *Vaccine*, 23(1), 114-26.
20. Shrinivasan A, Dick JD, Perl TM, 2002, Vancomycin resistance in *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 15, 430-8.
21. Wall RJ, 1996, Transgenic livestock: Progress and prospects for the future, *Theriogenology*, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 45 (1), 57-68.
22. Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR, 1997, Transgenic Dairy Cattle: Genetic Engineering on a Large Scale, *Journal of Dairy Science*, 80 (9), 2213-24.
23. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT, Schukken YH, 2001, Cow- and Quarter-Level Risk Factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* Mastitis, *Journal of Dairy Science*, 84(12), 2649-63.

HORMONALNA INDUKCIJA LAKTACIJE KOD JUNICE - PRIKAZ SLUČAJA

ARTIFICIAL INDUCTION OF LACTATION IN HEIFER - CASE REPORT

Milovanović Aleksandar*, Barna Tomislav*, Lazarević Miodrag**,
Ćupić Vitomir**, Milovanović Branko***

*Naučni institut za veterinarstvo - "Novi Sad";

**Fakultet veterinarske medicine, Beograd;

***PVS "Prima Veta Medic" d.o.o. Koceljeva

Kratak sadržaj

U ovom radu opisan je postupak indukcije laktacije kod junice simentalске rase nakon prekida graviditeta od 320 dana i manuelne ekstrakcije mumifikovanog ploda. Mesec dana nakon pobačaja primenjen je protokol indukcije koji je prilagođen dostupnim hormonima na našem tržištu. Korišćeni su preparati prostaglandina, progesterona, estradiola, kortikosteroida i ksilazina. Nakon završetka protokola od 27 dana započeta je masaža vimena i sisa od po 5 minuta. Petnaestog dana namuženo je 6 litara mleka, 30. dana 9 litara, a 90. dana maksimalnih 15 litara. Proizvedeno je 3.800 litara mleka (obračunato na 305 dana laktacije), što je odgovaralo vrednostima muznog proseka krava u domaćinstvu.

U indukovanoj laktaciji uspostavljen je graviditet i normalan partus nakon tretmana cističnih jajnika, endometritisa i trokratnog osemenjavanja, uz servis period od 185 dana.

Ukupna vrednost utrošenih lekova iznosila je 140 evra.

U navedenom slučaju indukcija laktacije radi održanja grla u stadu može biti alternativa kupovini junice za remont.

Ključne reči: indukcija laktacije, krave.

Summary

This paper describes the induction of lactation in Simmental heifers after termination of pregnancy of 320 days and manual extraction of mummified foetus. A month after the abortion induction protocol was applied according to the adjusted hormones available in the market. Prostaglandins, progesterone, estradiol, corticosteroids and xylazine were used. After completion of the protocol of 27 days, teats and udders of cow were massaged for five minutes. On the 15th and 30th day in milk, 6 and 9 litres were milked, respectively, reaching nadir of 15 litres at 90 days.

Total production was 3,800 litres of milk (calculated on 305 days of lactation), which corresponds to the average values of the householder's stable.

In the induced lactation pregnancy and normal parturition after treatment of cystic ovaries, endometritis and three inseminations with 185 open day period was achieved.

Cost of drugs for the induction protocol was 140 euros.

In this case, induction of lactation for keeping cow in a herd may be an alternative to purchasing replacement heifers.

Keywords: *induction of lactation, cows.*

IZNENADNA SMRT KRMAČA IZAZVANA KLOSTRIDIJALNIM INFEKCIJAMA

SUDDEN DEATH OF SOWS CAUSED BY CLOSTRIDIAL INFECTIONS

**Došen Radoslav, Prodanov-Radulović Jasna, Pušić Ivan,
Milanov Dubravka**

*Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“,
Rumenački put 20, 21000 Novi Sad*

Kratak sadržaj

Mortalitet krmača značajno utiče na profit u proizvodnji svinja, jer uzrokuje manji broj proizvedene prasadi po krmači godišnje i uvećava troškove zamene krmača. Idealno, mortalitet krmača na farmi iznosi manje od 3%, ali je na žalost često ovaj procenat mnogo veći, preko 10%. Brojni razlozi mogu biti uzrok uginuća krmača: srčana insuficijencija, torzije trbušnih organa, cistitis i pijelonefritis, endometritis, prolapsus materice, pneumonije, ulkus na želucu, sindrom pada krmača i drugo. Iznenađna smrt krmača je često posledica infekcije sa klostridijama. Klostridije predstavljaju heterolognu grupu bakterija koja obuhvata 15 patogenih vrsta, koji proizvode najmoćnije toksine. U radu je analiziran problem i uzroci iznenadne („naprasne“) smrti krmača na tri farme, kapaciteta 800-110 krmača. Farme su zatvorenog tipa i vršile su uvoz priplodnih jedinki (Nemačka, Danska i Francuska). Na ispitivanim farmama su realizovane sve neophodne mere biosigurnosti. Izvršen je patomorfološki pregled uginulih krmača i uzorkovanje parenhimatoznih organa za laboratorijska ispitivanja. Patomorfološki nalaz se odlikovao brzim razvojem meteorizma abdominalnih organa, krvav sadržaj u abdominalnoj duplji, uvećana slezina i jetra, na poprečnom preseku organi su imali izgled saća (prisutan gas). Primenom standardnih bakterioloških laboratorijskih metoda iz organa je izolovan *Clostridium perfringens*. Pored toga, izolovani su i *Staphylococcus aureus*, *E. coli hem.*, *E. coli*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilli*. Interesantan nalaz je da je na istim farmama iz organa uginule prasadi i organa pobačenih fetusa često bio izolovan *Clostridium perfringens*.

Ključne reči: iznenadno uginuće krmača, klostridije.

Summary

Sows mortality significantly affects profits in swine production, because causes a small number of pigs produced per sow per year and increases the cost of replacement sows. Ideally, the mortality of sows on the farm is less than 3%, but unfortunately often this percentage is much higher than 10%. A number of reasons can be the cause of death in sows: heart failure, torsions and accidents of abdominal organs, cystitis and pyelonephritis, endometritis, uterine prolapses, pneumonia, gastric ulcers, downer sow syndrome, and more.

Sudden death is often the outcome of infection with clostridia. Clostridia comprise a heterogenous group of environmental bacteria containing 15 pathogenic species, which produce the most potent toxins. In this paper, the problem and causes sudden death of sows on three farms with a capacity 800-110 sows were analysed. The swine farms were enclosed-type and recently they carried out the import of breeding animals (Germany, Denmark and France). Evaluated swine farms have fulfilled all the necessary bio-security measures. After death of sow, the pathomorphological examination and sampling of parenchymal organs for laboratory testing was carried out. The pathomorphological findings were characterized by rapid development meteorism of abdominal organs, blood content in the abdominal cavity, enlarged spleen and liver, the cross section of organs like a honeycomb (gas). By standard bacteriological laboratory methods *Clostridium perfringens* was isolated from organs deriving from dead sows. In addition, the following bacteria were isolated: *Staphylococcus aureus*, *E. coli* hem., *E. coli*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilli*. An interesting finding is that on the same farm from organs of dead piglets and aborted fetuses *Clostridium perfringens* has been frequently isolated.

Key words: sudden death of sows, *Clostridium*.

Literatura:

1. Chagnon M, D'Allaire S, Drolet R, 1991, A prospective study of sow mortality in breeding herds, *Can J Vet Res*, 55(2):180–184.
2. Friendship CR, Bilkei G, 2007, Concurrent swine erysipelas and *Clostridium novyi* infections associated with sow mortality in outdoor sows in Kenya, *The Vet Journal* 173,694–696

**UTICAJ VELIČINE TESTISA BIKA NA PROIZVODNJU SPERME
U CENTRIMA ZA VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE**

***THE INFLUENCE OF TESTICULAR SIZE OF BULL ON SPERM PRODUCTION IN
ARTIFICIAL INSEMINATION CENTERS***

Prka Igor

Stočarsko veterinarski Centar Krnjača, Beograd

Kratak sadržaj

Izbor bikova za veštačko osemenjavanje počinje od teladi koja su dobijena od visokovrednih roditelja, bikovskih očeva i bikovskih majki. Dobijena telad posle laboratorijskih ispitivanja, preuzimaju se u centar za v.o. i nakon boravka u karantinu prelaze u testnu stanicu. Sa navršenih dvanaest meseci vrše se merenja eksterijera grla. Jedna od mera koja se evidentira je i obim testisa. Na osnovu veličine testisa moguće je dobiti prognozu eventualne proizvodnje sperme. Za utvrđivanje veličine testisa (testikularna biometrija), koriste se trake ili lenjiri.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li postoji uticaj veličine testisa na proizvodnju sperme kod mladih bikova koji se koriste za v.o. U tu svrhu korišćeni su podaci o obimu testisa kod jednogodišnjih bikova koji tek počinju sa proizvodnjom sperme i upoređivani su sa određenim parametrima kvaliteta semena i to volumenom ejakulata, koncentracijom i procentom živih i progresivno pokretljivih spermatozoida.

U analizu su bili uključeni svi mladi bikovi koji su u periodu od 2010. do 2012.godine počinjali sa proizvodnjom semena, i to preko 30 bikova različitih rasa (simentalska, holštajn frizijska, montafonska). Kod njih su nakon merenja obima testisa praćeni parametri kvaliteta sperme tokom narednih godinu dana korišćenja.

Ključne reči: obim testisa, testikularna biometrija, parametri kvaliteta semena.

Summary

Selection of bulls for artificial insemination begins from the calves obtained from the high value parents, bull sires and bull dams. The resulting calves after laboratory tests are taken at the center and after a stay in quarantine they go to the test station. From the age of twelve months are measured exterior traits. One of the measures that can record are the testicular size. Based on the size of the

testicles we can get the possible prediction of sperm production. To determine the size of the testicles (testicular biometry), using the tape or ruler.

The objective of this study was to determine whether there is an impact of the testicular size on sperm production in young bulls used in artificial insemination. For this purpose, the data of testicular size in yearling bulls who are just starting with the production of sperm, and were compared with a certain parameters of semen quality like volume of ejaculate, concentration and the percentage of live and progressively motile sperm.

The analysis included all young bulls in the period since 2010 to 2012 year began producing semen, and over 30 bulls of different breeds (Simmental, Holstein Friesian, Montafon). Those bulls after measuring the testicular size, sperm quality parameters monitored during the next year of use.

Key words: *testicular size, testicular biometry, parameters of semen quality.*

Uvod

Jedan od preduslova za unapređenje stočarske proizvodnje u našoj zemlji je odabir plodnih i genetski kvalitetnih priplodnjaka. Priplodni bikovi, čija se sperma koristi za veštačko osemenjavanje, biraju se prvenstveno na osnovu odgajivačkih ciljeva koji se žele postići, odnosno genetskog potencijala određenog priplodnjaka.

Uzrast kada počinju da funkcionišu reproduktivne funkcije kod životinja obično se definiše kao pubertet. To odgovara promenama u nivou hormona i sposobnosti da seksualno funkcionišu kako bi se reprodukovali. Preciznije, pubertet se može definisati kod bikova i kao uzrast u kojem je životinja prvi put sposobna da proizvede ejakulat koji sadrži 50 miliona spermatozoida sa minimalno 10 % pokretljivih. Uzrast i težina kada se pubertet javlja zavisi od rase i stepena ishrane u toku razvoja. Istraživanja sa različitim rasama su pokazala da je praktični pokazatelj prisutnog puberteta kada je obim testisa između 27 i 29 cm (Lunstra i sar. 1978.). Međutim, činjenica da je bik dostigao pubertet i proizvodi spermu ne znači nužno i da je ona visoko fertilna. Rast testisa se ubrzava u pubertetu (6-13 meseci starosti) a sam obim testisa se povećava sve do starosti od pet-šest godina.

Ishrana sa izuzetno niskim energetske sadržajem može odložiti pubertet i potencijalno proizvodnju sperme. Sem toga, bikovi koji su bili izgledniji u mladosti nikada se ne mogu adekvatno razviti u poređenju sa bikovima koji su adekvatno hranjeni (Van Demark i sar. 1964). Takođe i naslage masnog tkiva u skrotumu mogu ugroziti pravilnu termoregulaciju.

Kako se povećava obim testisa, tako se povećava dnevna proizvodnja sperme visokog kvaliteta. Takođe postoji pozitivna genetska korelacija između obima testisa bikovskog oca i obima testisa njegovog sina, što ukazuje na to da

bikovi sa većim obimom testisa isto daju sinove sa većim obimom testisa. Što se tiče nivoa steonosti njegovih kćerki, postoji pozitivna korelacija, dok za starost ulaska junica u pubertet postoji negativna korelacija. To znači da kćerke bikova sa većim obimom testisa bi trebalo da uđu u pubertet kao mlađe.

Tabela 1. Minimalni kriterijumi za veličinu testisa

Starost	obim testisa (cm)
<15 meseci	30
15 - 18 meseci	31
18 - 21 meseci	32
21 - 24 meseci	33
> 24 meseca	34

Busch 1993.

Obim testisa kod bikova do jedne godine starosti treba biti veći od 30 cm, a kod starijih bikova veći od 36 cm. Razvoj testisa kod bika je visoko nasledna osobina (heritabilitet je oko 70%). U tabeli 1 dati su neki od kriterijuma za veličinu testisa bika.

Testisi imaju dve funkcije: proizvodnju spermatozoida i proizvodnju hormona, testosterona. Testisi su postavljeni izvan tela u skrotumu. Ovo je od suštinskog značaja za normalno funkcionisanje na temperaturi nižoj za nekoliko stepeni u odnosu na normalnu telesnu temperaturu.

Skrotum je važan radi regulisanja temperature testisa. To se radi pomoću temperaturno osetljivog sloja mišića koji se nalazi u zidu skrotuma. Ovaj mišić se opušta kada je toplo i kontrahuje kada je hladno. Gubitkom pokretljivosti dolazi do hipertermije u unutrašnjosti skrotuma i testisa, što za posledicu ima smanjenje kvaliteta ejakulata.

Postoje tri osnovna oblika skrotuma kod bikova. Prvi je normalni ili skrotum u obliku boce, zatim sa ravnim ivicama i klinast skrotum. Bikovi koji imaju normalni skrotum imaju i najbolji razvoj i najbolju kontrolu temperature testisa.

Pregled bika neophodno je obaviti, da se potvrdi, odnosno, da se na vreme dijagnostikuje eventualna neplodnost. Posle završenog opšteg kliničkog, prelazi se na androloški pregled. Posle pregleda spoljašnjih polnih organa pažljivo se palpiraju testisi, epididimisi, koža skrotuma, pokretljivost testisa u skrotumu i funikulus spermaticus.

Pregledom skrotuma i testisa ocenjujemo odgovara li veličina uzrastu bika, simetričnost leve i desne strane skrotuma i eventualno prisustvo patoloških promena na skrotumu (ekcemi, rane, povrede, ektoparaziti). Veličina skrotuma i testisa mora odgovarati starosti i rasi priplodnjaka, a leva i desna strana trebaju biti približno simetrične, bez patoloških promena. Nakon što bika fiksiramo,

između zadnjih nogu palpiramo sa obe ruke njegove polne organe. Prilikom palpacije skrotuma pažnju treba obratiti na temperiranost, bolnost, veličinu, konzistenciju i pokretljivost te glatkoću testisa i epididimisa. Oni se lako palpiraju kroz zid skrotuma i pokretljivi su u skrotumu, glatke i ravne površine te elastične konzistencije. Na patološko stanje upućuju nas testasta konzistencija kože skrotuma, fluktuacija u njegovoj šupljini, nepokretljivost testisa, nalaz čvorića, zadebljanja, otvrdnuća, promena konzistencije te vidno smanjenje ili povećanje jednog ili oba testisa. Skrotum i testisi fiziološki trebaju biti bezbolni i temperature približne ostalim delovima kože. Temperiranost određujemo tako da poleđinu dlana prislonimo na skrotum. Naročito je važno da testisi budu pokretljivi, jer je u protivnom onemogućena njihova termoregulacija koja se sprovodi približavanjem ili udaljavanjem od tela.

Česti slučajevi slabe plodnosti kod bikova su abnormalni testisi. Testisi trebaju da su simetrični, približno iste veličine i slobodno pokretni u skrotumu. Mala veličina ili degeneracija često pogađaju jedan testis i predstavljaju problem (Blezinger S.B., 2002.) .

Merenje obima testisa je indirektno procenjivanje mase tkiva testisa. Za utvrđivanje veličine testisa (testikularna biometrija) koriste se trake ili lenjiri.

Obim testisa se lako meri metalnom pantljikom na samopovlačenje. Bik se prvo fiksira rudom i alkom, stane se iza bika, jednom rukom se uhvati za vrat skrotuma i uz blagi pritisak povuče nadole. Palac i ostali prsti se postavljaju na skrotum (Rupesh J. i sar. 2008.)



Kad je hladno vreme testisi kod bikova se povlače, otežavajući njihovo merenje. Mora se paziti da su testisi pozicionirani na dnu skrotuma, a nabore na skrotumu treba eliminisati što je više moguće. Dok se jednom rukom testisi drže u poziciji, omča pantljike se stavi drugom rukom. Staviti traku pažljivo oko najšireg obima skrotuma. Treba izbeći stavljanje palca između testisa, jer će to povećati obim. Glavni faktori koji određuju veličinu testisa su starost bika, rasa i nivo uhranjenosti. U praksi, starost, je najznačajnija. Razlike među rasama su relativno male. Nutritivni stres može prouzrokovati zastoj u razvoju testisa kod mladih bikova, posebno ako se javi između 9-15 meseca kada je razvoj testisa u kritičnoj fazi.

Slika 1. Merenje obima testisa bika

Od bikova bilo kojeg uzrasta sa obimom testisa od 340 mm i više, može se očekivati da imaju zadovoljavajuću proizvodnju sperme. Međutim, kod bikova preko 15 meseci starosti sa obimom testisa manjim od 300 mm proizvodnja sperme će biti značajno manja.

Materijal i metode

U analizu su bili uključeni svi mladi bikovi koji su u periodu od 2010. do 2012.godine počinjali sa proizvodnjom semena, i to preko 30 bikova različitih rasa (simentalska, holštajn frizijska, montafonska). Kod njih su nakon merenja obima testisa praćeni parametri kvaliteta sperme tokom narednih godinu dana korišćenja.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li postoji uticaj veličine testisa na proizvodnju sperme kod mladih bikova koji se koriste za v.o. U tu svrhu korišćeni su podaci o obimu testisa kod jednogodišnjih bikova koji tek počinju sa proizvodnjom sperme i upoređivani su sa određenim parametrima kvaliteta semena i to volumenom ejakulata, koncentracijom i procentom živih i progresivno pokretnih spermatozoida.

Rezultati i diskusija

Obrađeni podaci su prezentovani u tabeli 2 i grafikonima 1,2 i 3.

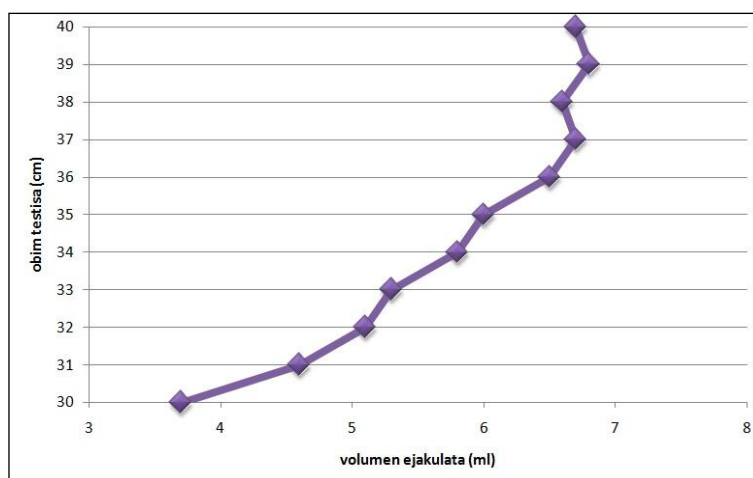
Tabela 2. Parametri kvaliteta sperme u poređenju sa obimom testisa

broj bikova	obim testisa (cm)	Parametri kvaliteta sperme (prosečna vrednost za 12 meseci - valjanih ejakulata)			% odbačenih ejakulata
		volumen (ml)	koncentracija (mlrd/ml)	% živih i prog.pokretnih	
2	< 30	3,7	0,85	78	72
2	31	4,6	1,23	81	39
2	32	5,1	1,28	84	25
2	33	5,3	1,32	86	15
5	34	5,8	1,35	84	13
6	35	6,0	1,45	82	11
3	36	6,5	1,58	86	10
2	37	6,7	1,49	85	7
4	38	6,6	1,38	87	8
3	39	6,8	1,41	86	9
5	> 40	6,7	1,46	84	7

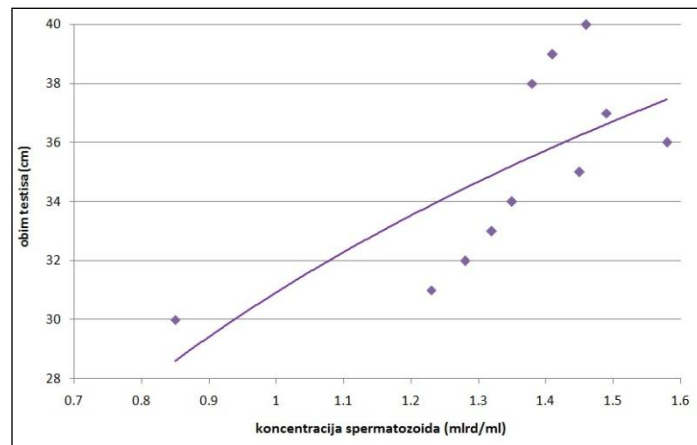
Analizirano je ukupno 36 bikova različitih rasa. Obim testisa se kretao od manje od 30 cm do preko 40 cm (tabela 2). Podaci o bikovima su podeljeni po grupama u skladu sa obimom testisa, a zatim upoređivani sa osnovnim parametrima kvaliteta sperme (volumen, broj spermatozoida – koncentracija i % živih i progresivno pokretljivih spermatozoida, kao i % odbačenih ejakulata). Parametri kvaliteta sperme su predstavljeni kao prosečne vrednosti valjanih ejakulata, dobijenih tokom 12 meseci korišćenja tih bikova. Velika većina bikova je imala obim testisa veći od minimuma potrebnog da bi ušli u proizvodnju sperme.

Kao što je predstavljeno u grafikonu 1, vidi se da je sa porastom obima testisa rasla i prosečna količina ejakulata i to od 3,7 ml za grupu bikova sa obimom testisa ispod 30 cm, do 6,7 ml za bikove koji su imali obim testisa preko 40 cm. Kada se radi o broju spermatozoida, dobijeni rezultati pokazuju da je trend da sa porastom obima testisa raste i koncentracija spermatozoida (grafikon 2). Vrednosti rastu do obima testisa od 36 cm, da bi posle toga i dalje bile visoke ali sa oscilacijama.

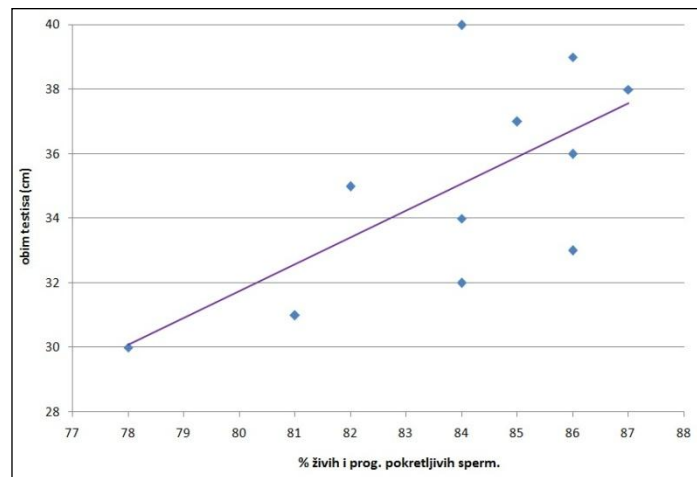
U grafikonu 3 vidi se odnos obima testisa i % živih i progresivno pokretljivih spermatozoida. Što se tiče ovog parametra kvaliteta sperme i njegova linija trenda pokazuje porast kako raste i obim testisa kod bikova uzetih u analizu. Procenat odbačenih ejakulata se kreće od 72% kod bikova sa obimom testisa manjim od 30 cm do ispod 10% kod bikova sa obimom testisa većim od 35 cm. Veliki procenat odbačenih ejakulata kao i oscilacije u ovoj vrednosti su razumljivi s obzirom da su u pitanju mladi jednogodišnji bikovi koji su tek počinjali sa proizvodnjom sperme.



Grafikon 1. Obim testisa bikova u poređenju sa volumenom ejakulata



Grafikon 2. Obim testisa bikova u poređenju sa koncentracijom spermatozoida



Grafikon 3. Obim testisa bikova u poređenju sa % živih i prog.pokretljivih spermatozoida

U stranoj literaturi većina tekstova se bavi pronalaženjem što jednostavnijeg načina predviđanja buduće proizvodnje sperme kod genetski visoko vrednih priplodnih bikova. Merenje obima testisa je svakako najjednostavniji i najbrži način da se napravi selekcija među bikovima koji ulaze u proizvodnju u centrima za veštačko osemenjavanje.

Bikovi sa malim testisima nemaju samo malu proizvodnju sperme, već je to i često udruženo sa drugim problemima koji ih čine subfertilnim ili neplodnim. Neplodnost udružena sa malim testisima je često posledica nerazvijenosti ili nedovoljne razvijenosti ovih organa ili je posledica degeneracije testisa. Poneki bikovi sa obimom testisa od 29 cm i manje nemaju proizvodnju sperme uopšte

(Mathur A. i sar. 2008). Neki bikovi sa obimom testisa manjim od proseka mogu biti fertilni u početku (godinu-dve) a onda da postanu manje plodni ili potpuno sterilni jer im tubuli u testisima degenerišu ranije i mnogo brže nego kod normalnih bikova. (Barth A.D., i Ominski K.H., 2000.)

Pregledi sperme obavljaju se kod životinja starosti od 10 do 13 meseci, pri čemu se obraća pažnja na oscilacije u volumenu i kvalitetu ejakulata. Bikovi koji treba da se uvode u centre za v.o. radi proizvodnje sperme treba da imaju najmanje 5 ejakulata od kojih 2/3 valjanih.

Zaključak

Veličina testisa je odličan pokazatelj plodnosti bika i postoji značajna korelacija između obima testisa i parametara kvaliteta sperme (volumena ejakulata, koncentracije spermatozoida, % živih i progresivno pokretljivih spermatozoida). Postoji takođe potreba da se značajnije ispita genetska povezanost između obima testisa kod bika i plodnosti njihovih kćerki.

Literatura:

1. Barth A.D., and Ominski K.H., 2000, The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls, *Can.Vet.J.*vol.41, 541-546.
2. Blezinger S.B., 2002, Age at puberty and scrotal circumference are important factors in bull selection, *Cattle today*.
3. Cergolj M, Samardžija M., 2006, *Veterinarska andrologija*, 165-170.
4. Coe PH, Gibson CD., 1993, Adjusted 200-day scrotal size as a predictor of 365-day scrotal circumference. *Theriogenology* 40: 1065-1072.
5. Kroker G., 2011, Soundness of Testicles in Beef Bulls, *Journal of Depart. of Env. and Primary Industries*, Victoria, Australia, 25-30.
6. Mathur A.K., Mandal D.K., Kumar M., Tyagi S., 2006, Biometry of testes in Friesian bulls, *The Ind.Journal of Anim.Sci*, 76.
7. Perry G and Patterson D., 2011, Determining Reproductive Fertility in Herd Bulls, *Beef breeding* 1-4.
8. Pratt SL, Spitzer JC, Webster HW, Hupp HD, Bridges WC Jr., 1991, Comparison of methods for predicting scrotal circumference to growth traits in beef bulls. *J Anim Sci*, 69:271 1-2720.
9. Rupesh J., Mohantyad T.K., Pankay P.K., 2008, Study of relationship of age, testicular biometry and semen characteristics in bulls of Sahiwal and Friesian crosses, *J.Dairyng, Foods and H.S.*, 27 (3/4), 175-180.
10. Vuković D., Perković S., 2012, *Veštačko osemenjavanje, plodnost i neplodnost goveda*, 19-25.

**UPOTREBA RIGID KOLPOSKOPA U SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI
REPRODUKTIVNIH STANJA POLNIH ORGANA KRAVA**

***USING OF RIGID COLPOSCOPE IN CONTEMPORARY DIAGNOSTICS
OF THE REPRODUCTIVE HEALTH STATUS IN COWS***

**Jovičin Milovan¹, Kovačević Mira¹, Milovanović Aleksandar¹,
Barna Tomislav¹, Dražić Mirko², Etinski Novak³, Erdeljan Mihajlo⁴**

*¹ Naučni Institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad; ² Veterinarska
klinika, Kač; ³PIK "Bečej", Bečej; ⁴ Departman za veterinarsku
medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

Kratak sadržaj

Kolposkop za savremenu dijagnostiku reproduktivnog stanja polnih organa i znakova polnog žara krava plotkinja je instrument koji se koristi u veterinarskoj medicini za vaginalni pregled krava i junica. Obezbeđuje jasnu i uveličanu sliku proširenog vidnog polja grlića materice i zida vagine. Slika u boji, visoke rezolucije, bežično se daljinski upućuje na odgovarajući ekran. Proširenje vidnog polja prednjeg dela vagine i grlića materice krava plotkinja omogućuje cilindrični naglavak. Providna etilenska folija za jednokratnu upotrebu osigurava epizootiološku sigurnost. Kolposkop je dizajniran prema ergonomskim zahtevima. Prikazane su slike fiziološki normalnih i patološki promenjenih *portio vaginalis uteri*.

Ključne reči: kolposkopija, krave, LED osvetljenje, providna etilenska folija.

Summary

Colposcope for contemporary diagnostics of the reproductive health status and heat signs in breeding cows is an instrument that is used in veterinary medicine for vaginal examination cows and heifers. Provides a clear and magnified image of the extended field of view cervix and vaginal wall. Color images, high resolution, wireless remote is referred to the appropriate screen. Expansion of the field of view front part of the vagina and cervix breeding cows allows cylindrical sleeve. Transparent ethylene disposable foil, ensures safety epizootic. The colposcope is designed according to ergonomic requirements. Showed pictures include physiologically normal and pathologically changed *portio vaginalis uteri*.

Key word: colposcopy, cows, LED, transparent ethylene foil.

ENDOMETRITIS KAO UZROK STERILITETA KRMAČA

ENDOMETRITIS AS A CAUSE OF SOWS STERILITY

Prodanov-Radulović Jasna¹, Došen Radoslav¹,
Milanov Dubravka¹, Urošević Miroslav²

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Rumeančki put 20,
21000 Novi Sad; ² Srednja veterinarska škola, Carice Milice 2, Futog

Kratak sadržaj

Industrijski način svinjarske proizvodnje karakteriše forsiran uzgoj i on ima za posledicu kratak proizvodni vek krmače, najčešće zbog pojave steriliteta. Najčešći razlog isključenja krmača iz proizvodnje je neplodnost i zbog pojave iste isključi se 40-60% krmača. Cilj rada je bio utvrđivanje prisustva bakterijske mikroflore u materici isključenih krmača sa kliničkom i supkliničkom formom endometritisa. Materijal za istraživanje je obuhvatao krmače kod kojih su utvrđeni klinički znaci endometritisa kao i krmače koje su isključene iz proizvodnje bez kliničkih znakova infekcije reproduktivnog trakta. Materijal za ispitivanja je obuhvatao reproduktivne organe nakon klanja isključenih krmača. Primenjene metode ispitivanja su obuhvatale: anamnestička i klinička ispitivanja, patomorfološki pregled i standardne laboratorijske metode za utvrđivanje prisustva aerobnih i anaerobnih bakterija. Kliničkim pregledom kod većeg broja krmača na farmi ustanovljen je beličasto-zamućen iscedak iz vulve, dok je kod malog broja plotkinja iscedak bio krvav. Patomorfološki pregled je obavljen na uzorku od 61 uterusa krmača, koje su isključene zbog steriliteta. Mikrobiološkim pregledom 29 uzoraka vaginalnih briseva izolovana je sledeća bakterijska mikroflora: *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus α-haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* i mešana gram-negativna bakterijska flora. Na uzorku od 10 materica isključenih krmača najčešće je ustanovljena mešana infekcija: *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pasteurella aerogenes*, *Clostridium perfringens*, *E.coli haemolytica*.

Ključne reči: isključene krmače, endometritis.

Summary

Industrial way of swine production is characterized by forced breeding. A consequence is a short life of sows, most often due to sterility. The most common reason for excluding sows is barrenness (40-60%). The aim of the paper was to evaluate the bacterial microflora in uterus of the excluded sows with clinical and subclinical form of endometritis. The material for this investigation included the sows excluded from raising due to clinical signs of endometritis and excluded sows with no clinical signs of infection of reproductive organs. The sows excluded from further reproduction were slaughtered and their reproductive organs were examined. The applied research methods included: anamnestic and clinical evaluation, pathomorphological examination, standard laboratory testing for detection the presence of aerobic and anaerobic bacteria in the samples of reproductive organs. By clinical examination of sows in the most of the cases vulvar discharge was detected (purulent or mixed with blood). The pathomorphological examination was done on 61 uterus, deriving from sows excluded from production due to infertility. Applying bacteriological test on 29 samples of vaginal smear the following bacterial microflora was isolated: *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* α -haemolyticus, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* and mixed gram-negative bacterial flora. From the excluded sows on samples of 10 uterus, the most common result of laboratory test was mixed infection: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pasteurella aerogenes*, *Clostridium perfringens*, *E.coli* *haemolytica*.

Key words: endometritis, sow infertility.

Literatura:

1. Došen R, Gagrčin M, Prodanov J, 2002, Sterilitet plotkinja kao posledica bolesti reproduktivnog trakta, *Veterinarski glasnik*, 56, 1/2, 105-110.
2. Došen R, Stančić B, Prodanov J, Lalić M, Orlić D, 2002, Correlation between exclusion of sows with their pathomorphological changes on genital organs, Proceedings 9th International Conference for Ovine and Caprine Production, 7th International Symposium on Animal Reproduction, 4-7 September, Ohrid, p. 70.

IZOLACIJA HISTOPHILUS SOMNI IZ POSTELJICE KRAVE

ISOLATION OF HISTOPHILUS SOMNI FROM COW PLACENTA

**Radanović Oliver, Kureljušić Branislav, Jakić-Dimić Dobrila,
Žutić Jadranka, Savić Božidar, Cvetojević Đorđe**

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Vojvode Toze 14

Kratak sadržaj

Histophilus somni (*H. somni*) jedan je od oportunističkih patogena respiratornog i reproduktivnog sistema kod goveda. Ovde opisujemo izolaciju *H. somni* iz posteljice krave nakon prevremenog partusa. Na laboratorijski pregled dostavljen je uzorak posteljice, koji je zasejan na odgovarajuće podloge i inkubirane 24-48 sati u aerobnim, mikroaerofilnim i u uslovima sa 10% CO₂. Na podlogama inkubiranim u mikroaerofilnim uslovima zapažen je nakon 48 sati obilan rast u vidu sitnih nehemolitičnih kolonija u čistoj kulturi.

U mikroskopskom preparatu uočeni su gram-negativni kokobacilarni oblici u paru ili pojedinačno. Kultura je pokazala pozitivnu reakciju oksidaze i negativnu na katalazu. Dalje je dokazana redukcija nitrata u nitrite, negativan test na ureu, razlaganje glukoze i manitola i negativna reakcija na saharozu i laktozu.

Na osnovu utvrđenih morfoloških, kulturelnih i biohemijskih osobina, bakterijska kultura je identifikovana kao *H. somni*.

Ključne reči: *Histophilus somni*, posteljica, krava.

Summary

Histophilus somni is a opportunistic pathogen of the reproductive and respiratory tracts of cattle. Here we describe the isolation of H. somni from cow placenta after premature birth. Samples were inoculated on corresponding medium and incubated 24-48 hours under aerobic, microaerophilic and 10% CO₂ condition. After 48 hours of incubation in microaerophilic condition abundant growth in the form non-haemolytic colonies in pure culture were observed. Gram-negative coccobacillary forms in pairs or individually were observed in the microscopic preparations. Culture is reduced nitrate to nitrite and showed a positive reaction to oxidase, glucose and manitol and negative to catalase, urea, sucrose and lactose. Based on the morphological and biochemical properties bacterial culture was identified as Histophilus somni.

Key words: *Histophilus somni*, placenta, cow.

**UPOREDNO ISPITIVANJE RAZLIČITIH POSTUPAKA TERAPIJE HRONIČNIH
ENDOMETRITISA NA TOK KLINIČKOG IZLEČENJA I PLODNOST KRAVA**

**COMPARATIVE STUDY ON DIFFERENT METHODS OF THERAPY OF CHRONIC
ENDOMETRITIS THE CLINICAL COURSE HEALING AND FERTILITY IN COWS**

Čitaković Vladimir*, Vakanjac Slobodanka,
Maletić Milan**, Đurić Miloje****

**Veterinarska stanica "Zdravlje vet" doo, Mionica*

***Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine*

Kratak sadržaj

U zapahtima visokomlečnih krava infekcije materice predstavljaju značajan problem. Hronični endometritis je najčešći uzrok neplodnosti, pa zato pravovremena dijagnostika i terapija imaju veoma značajnu ulogu u lečenju steriliteta i smanjenju neopravdanih ekonomskih gubitaka. Terapija endometritisa može biti parenteralna i podrazumeva sistemsku primenu najčešće hormona i antibiotika, i lokalna, koja podrazumeva primenu hormona, lokalnih intrauterinih antibiotika, ili intrauterinih antiseptika.

Cilj ovoga rada bio je ispitivanje terapijske efikasnosti intramuskulane primene Dinolytic®-a (25 mg dinoprost), u odnosu na intrauterinu primenu do sada najčešće korištenog uteroantiseptika 4% Lotagena (meta-krezol sulfonske kiseline), u terapiji hroničnih endometritisa. Ispitivanje je izvedeno na 90 krava, u periodu od oktobra 2007. do januara 2010. Najveći procenat koncepcije nađen je u grupi krava lečenih sa 25 mg dinoprost (93,3%), u grupi krava lečenih meta-krezol sulfonskom kiselinom (63,3%) i u netretiranoj kontrolnoj grupi (70,0%). U dužini servis perioda nije nađena statistički značajna razlika između oglednih grupa (grupa krava tretiranih sa 25 mg dinoprost 146 dana; grupa krava tretirana sa meta-krezol sulfonskom kiselinom 168 i kontrolna grupa 161 dan). Najveći procenat izlučenja bio je u kontrolnoj grupi (20,0%), u grupi krava tretiranih sa meta-krezol sulfonskom kiselinom bilo je 13,3% izlučenih krava, dok u grupi koja je tretirana sa 25 mg dinoprost nijedna krava nije izlučena.

Ključne reči: krava, dinoprost, Lotagen, hronični endometritis.

Summary

In herds of dairy cows uterine infections are a significant problem. Chronical endometritis is the most common cause of infertility, so timely diagnosis

and therapy have a very important role in the treatment of sterility and unjustified economic losses. Endometritis therapy may be systematic and usually involves systemic use of hormones and antibiotics, and local, which involves the use of hormones, local intrauterine infusion of antibiotics, or antiseptics.

The aim of this study was to investigate the therapeutic efficacy of i.m application of Dinolytic (25 mg of dinoprost) in relation to intrauterine application of so far the most frequently used uteroantiseptic Lotagen (meta-cresol sulfonic acid) at 4%, in the treatment of chronic endometritis. The study was conducted on 90 cows, from October 2007. by January 2010th. The largest percentage of conception was found in the group of cows treated with Dinolytic (93.3%) in the group of cows treated with Lotagen (63.3%) and control group (70.0%). No statistically significant differences was found between the length of service period in experimental groups (Dinolytic 146 days Lotagen 168, and 161 day in control group). The biggest percentage of removed cows was in the control group (20.0%) in Lotagen group was 13.3% of removed cows, while in Dinolytic group no cow was removed.

Key words: cow, dinoprost, Lotagen, chronic endometritis.

Bez obzira što je u poslednjih 40 god. u stručnoj literaturi objavljeno više od 500 radova o endometritisima i piometri krava sa aspekta etiopatogeneze, dijagnostike i terapije, procenat ovih oboljenja genitalnog trakta nije značajno smanjen. Procenjuje se da se endometritisi javljaju u širokom diapazonu od 7-10, odnosno 70,0%. Ovako velika širina u pojavi infekcije pre svega zavisi od uslova pod kojima protiče porođaj, od broja i patogenosti mikroorganizama, kao i statusa prirodnih odbrambenih snaga organizma u trenutku infekcije.

Zapaljenja endometrija dovode do značajnih ekonomskih gubitaka u zapaštima, jer se mnoge krave izluče zbog male proizvodnje mleka i trajne neplodnosti. Za endometritise se smatra i da su glavni razlog povadaanja i kao takvi predstavljaju pravi stručni izazov za vererinara.

Postoji čitav niz kontradiktornih podataka o postavljanju diagnoze, načinu lečenja, interpretacije dobijenih rezultata obzirom na klinička izlečenja i plodnost. Zato je i neophodno da se nastave istraživanja o postupcima terapije i kliničkog izlečenja u ovoj oblasti. Naročito bi trebalo da se dokumentuje i uporede rezultati da li je neophodno odmah po postavljanju dijagnoze: *Endometritis postpuerperalis chronica* preduzeti terapiju, ili treba da se sačeka i iskoristi fenomen „samočišćenja“ materice. Tokom fiziološkog toka graviditeta materica krava ne sadrži bakterije. Kontaminacija uterusa bakterijama najčešća je pri porođaju i neposredno posle toga. Bakterije iz neposredne okoline porodilje prodiru iz vagine, kroz cerviks, u matericu, a moguće su i hematogene infekcije (De kruif, 1994). U estrusu su odbrambeni mehanizmi vrlo efikasni, pa u ovo vreme skoro da i ne može doći do infekcije (Seals i sar., 2003). Međutim, ako se krava osemeni u diestrusu, vrlo lako dolazi do endometritisa. Bakteriološka

ispitivanja su pokazala da se prve dve nedelje post partum u više od 90,0% slučajeva nalaze bakterije u materici (Griffin i sar., 1974), pa se zato njena involucija smatra pre septičkim nego aseptičkim procesom (Tsousis, 2005). Značaj hroničnih endometritisa u etiopatogenezi neplodnosti goveda još uvek je veliki, jer se mnoge plotkinje izluče iz zapata zbog smanjene mlečnosti ili bezuspešnog višekratnog osemenjavanja. Zato, postoji potreba iznalaženja novih načina lečenja hroničnih endometritisa krava.

Cilj ovoga rada je bio da se ustanovi efikasnost intramuskularnog davanje preparata **prirodnog PGF₂α (Dinolytic)** i intrauterine aplikacije **4% rastvora meta-krezol sulfonske kiseline (Lotagen)** i dobijeni rezultati uporede sa grupom životinja kod kojih **nije preduzeto lečenje** i kod kojih treba da se iskoristi fenomen „samočišćenja“ materice.

Prva (ogledna) grupa - 30 krava, koje su tretirane sa 5 ml prirodnog prostaglandina (25 mg dinoprost), druga ogledna grupa - 30 krava koje su tretirane intrauterino sa 100 ml 4% rastvora meta-krezol sulfonskom kiselinom, treća grupa krava (30 krava) sa hroničnim endometritisom, koje nisu tretirane.

Za kliničku procenu stepena hroničnog endometritisa korišćen je ključ po **Grunert-u** (1990). Krave kod kojih je dijagnostikovao hronični endometritis II i III stepena lečene su na dva različita načina (PGF₂α i Lotagen).

Rezultati i diskusija

Procenat kliničkih izlečenja u oglednim i kontrolnoj grupi je visok. Najveći procenat koncepcije prisutan je u grupi krava lečenih sa 25 mg dinoprost (93,3%), dok je u druge dve grupe bio manji. U grupi krava lečenih meta-krezol sulfonskom kiselinom iznosio je 63,3% i kontrolnoj grupi 70,0%. Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika u koncepciji između oglednih grupa (Hi-kvadrat = 8,061; p = 0,018).

Bolji rezultati koncepcije od prvog osemenjavanja bili su u kontrolnoj (50,0%) i grupi krava tretiranih sa 25 mg dinoprost (43,3%), u odnosu na grupu krava tretiranih meta-krezol sulfonskom kiselinom (26,9%). Indeks osemenjavanja bio je manji u kontrolnoj grupi (1,71) u odnosu na grupu krava tretiranih sa 25 mg dinoprost (1,82) i grupu krava tretiranu sa meta-krezol sulfonskom kiselinom (1,89).

Jednofaktorskom analizom varijanse nije nađena statistički značajna razlika u dužini servis perioda između oglednih grupa (F = 0,522; p = 0,596), mada je sa ekonomskog i biološkog aspekta značajno da je servis period u grupi krava tretiranih sa 25 mg dinoprost kraći skoro za čitav ciklus (145,79 dana), u odnosu na grupu krava tretiranih sa meta-krezol sulfonskom kiselinom (167,68), i kontrolnu grupu krava (160,71 dana).

Bitan parametar za dobre reproduktivne pokazatelje je i da dužina servis perioda bude manja od 120 dana kod većeg broja životinja, pri čemu je u ovom radu kod 67,6% krava servis period bio duži od 120 dana.

Ukupna plodnost, tj. procenat steonih životinja u ogleđnoj grupi koja je tretirana sa 25 mg dinoprosta iznosio je 93,3%, u grupi krava tretiranih sa meta-krezol sulfonskom kiselinom 73,1%, a u kontrolnoj 87,5%, što nam ukazuje da u grupi koja je dobila 25 mg dinoprosta je 20,0% više steonih krava nego u grupi koja je ispirana sa meta-krezol sulfonskom kiselinom, odnosno 6,0% više nego u kontrolnoj grupi. Udeo ukupne plodnosti svih životinja uključenih u ogled iznosio je 85,0%, odnosno, samo 15,0% životinja iz ogleda nije koncipiralo.

Prosečan broj dana od telenja do početka terapije kod svih 90 krava bio je 40,09 dana. U grupi koja je tretirana sa 25 mg dinoprosta prosečan broj dana od telenja do početka terapije (43,70 dana) bio je veći nego u grupi koja je tretirana sa meta-krezol sulfonskom kiselinom (38,23 dana) i kontrolnoj grupi (38,33 dana). Jednofaktorskom analizom varijanse nije dobijena statistički značajna razlika u prosečnom broju dana proteklom od telenja do početka terapije između ogleđnih grupa ($F = 1,377$; $p = 0,258$).

Prosečan broj dana od početka terapije do uspešnog osemenjavanja iznosio je 115,94 dana kod 68 krava koje su koncipirale, i bio je manji u grupi koja je tretirana sa 25 mg dinoprosta (101,71 dan) u odnosu na grupu koja je tretirana sa meta-krezol sulfonskom kiselinom (129,84 dana) i kontrolnu grupu (122,84).

Najveći procenat izlučenja bio je u kontrolnoj grupi (20,0%). U grupi tretiranoj sa meta-krezol sulfonskom kiselinom bilo je 13,3% izlučenih krava, dok u grupi tretiranoj sa 25 mg dinoprosta nijedna krava nije izlučena. Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika u učestalosti izlučenja krava između ogleđnih grupa (Hi-kvadrat = 6,300; $p = 0,043$).

U literaturi se navode česti razlozi za izlučenje koji se odnose i na krave sa hroničnim endometritisom (Gröhn i sar., 2003). Glavni razlozi za ukupna izlučenja u ovom radu su niska proizvodnja mleka, mastitisi, artritis. Ovi rezultati u saglasnosti su sa podacima Tsousis-a (2005), koji je 26,5% životinja izlučio iz zapata, pri čemu su ključni razlozi bili poremećaj plodnosti, mastitisi i obolenja lokomotornog aparata. Steffan i sar. (1984) navode da su 12,8% životinja u netretiranoj grupi krava sa hroničnim endometritisom koje nisu koncipirale do 240 dana post partum izlučili iz zapata. U našem radu bilo je 11,1% izlučenih životinja u sve tri grupe, pri čemu je najveći procenat izlučenja u netretiranoj grupi (20,0%). Steffan i sar. (1984) izlučili su 12,8% životinja netretirane grupe krava sa hroničnim endometritisom, koje nisu koncipirale do 240 dana post partum. Ovi rezultati su približni onima, koje de Kruif i sar. (1998) navode kao referentne vrednosti.

U ovom radu izlučeno je iz zapata, posle 150. dana od telenja, 10 plodkinja (11,1%). Objašnjenje za ovako mali broj izlučenih krava moglo bi da bude odgovor na zahteve zootehničke službe da se obolela grla uporno leče. Ovi podaci su u saglasnosti sa rezultatima Heuwieser i sar. (2000), kod kojih je 16,2%

životinja izlučeno iz zapata. U pomenutom radu sve životinje sa servis periodom dužim od 200 dana izlučene su iz zapata.

Zaključak

Najveći efekat terapije na kliničko izlečenje i koncepciju, postignut je kod krava lečenih sa 25 mg dinoprost (93,30%), dok je kod druge dve grupe procenat steonosti bio manji. U grupi plodkinja lečenih lokalnom aplikacijom 100 ml 4% rastvora meta-krezolsulfonske kiseline iznosio je 63,30%, i kontrolnoj 70,00%, što je uslovalo dobijanje statistički značajnih razlika u koncepciji između oglednih grupa. Najveći procenat izlučenja bio je u kontrolnoj grupi (20,00%). U grupi koja je lokalno tretirana aplikacijom 100 ml 4% rastvora meta-krezolsulfonske kiseline, bilo je 13,30% izlučenih krava, dok u grupi koja je tretirana sa 25 mg dinoprost, nije bilo izlučenja. Hi- kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika u učestalosti izlučenja krava između oglednih grupa.

Literatura:

1. DE KRUIF, A. (1994): Postpartale Endometritis beim Rind. *Prakt. Tierarzt* 12, 1071-8
2. SEALS, R.C., M.C. WULSTER-RADCLIFFE u. G.S. LEWIS (2003): Uterine response to infectious bacteria in estrous cyclic ewes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 49, 269-78
3. GRÖHN Y.T., P.J. RAJ ALA-SCHULTZ, H.G. ALLORE, M.A. DELORENZO, J.A. HERTL u. D.T. GALLIGAN (2003): Optimizing replacement of dairy cows: modeling the effects of diseases. *Prev. Vet. Med.* 61, 27-43
4. GRIFFIN, J.F., P.J. HARTIGAN u. W.R. NUNN (1974a): Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1, 91-106
5. GRUNERT, E. (1986): Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten der Endometritis beim Rind. *Prakt. Tierarzt* 68, Colleg. Vet. XVII, 43-7
6. HEUWIESER, W., B.A. TENHAGEN, M. TISCHER, J. LUHR u. H. BLUM (2000): Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. *Vet. Rec.* 146, 338-41
7. STEFFAN, J., M. AGRIC, S. ANDRIAMANGA u. M. THIBIER (1984): Treatment of metritis with antibiotics or prostaglandin F_{2a} and influence of ovarian cyclicity in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1090-3
8. TSOUSIS, G. (2005): Strategien der Endometritisbehandlung und Auswirkung auf die klinische Heilung und die Fruchtbarkeit von Milchkühen im Rahmen der Integrierten Tierärztlichen Bestandsbetreuung. Dis. durch die Tierärz. Hochsch. Hannover.

**UTICAJ STRUKTURE HROMATINA SPERMATOZOIDA NA
OPRASIVOST I VELIČINU LEGLA**

***THE INFLUENCE OF SPERM CHROMATIN STRUCTURE ON
BOARS' FERTILITY AND LITTER SIZE***

Vasiljević Teodora*, Milovanović Aleksandar,
Barna Tomislav**, Lazarević Miodrag*****

**AD "Napredak", Stara Pazova; **Naučni institut za veterinarstvo –
"Novi Sad"; ***Fakultet veterinarske medicine, Beograd*

Kratak sadržaj

Test strukture hromatina spermatozoida (SCSA test) daje informacije o statusu DNK. U poslednjoj dekadi objavljeni su brojni podaci o plodnosti ljudi i životinja koji ukazuju da fragmentacija i/ili degeneracija DNK spermatozoida može imati negativan uticaj na oplodnu sposobnost spermatozoida. Kod uniparih životinja smanjen je stepen koncepcije dok je kod pluriparih vrsta smanjen broj potomaka u leglu. Ovaj parametar nije povezan sa pokretljivošću spermatozoida, njihovim morfološkim odlikama, niti se može kompenzovati povećanjem broja spermatozoida u dozi.

Kvalitet semena je ispitivan kod 38 nerastova u tromesečnim intervalima. Izvršena je analiza uticaja stepena oštećenja hromatina na ukupnom broju od 532 prašenja (8 038 prasadi). Nerastovi su bili podeljeni na grupu A (n=33, sa SCSA oštećenjima <15%) i grupu B (n=5, sa SCSA oštećenjima ≥15%).

Ukupna pokretljivost spermatozoida bila je bolja u grupi B ($80,77 \pm 8,79$: $73,73 \pm 15,51\%$, $P < 0,05$), dok u progresivnoj pokretljivosti spermatozoida nije bilo značajnih razlika između grupa ($34,80 \pm 9,77\%$: $36,53 \pm 6,30\%$). Oprasivost ($78,66\%$ prema $72,41\%$; $P = 0,018$), kao i ukupan broj prasadi u leglu ($14,79:13,76$; $P = 0,0013$) bili su statistički značajno, odnosno vrlo značajno različiti.

Na osnovu sprovedenih istraživanja je moguće zaključiti da je primenom SCSA testa moguće otkriti nerastove sa potencijalno slabijom plodnošću i sa manjim leglima.

Ključne reči: nerast, plodnost, SCSA.

Summary

Sperm chromatin structure assay (SCSA) provides information on the integrity of the DNA. A number of studies in the last decade have indicated that DNA sperm fragmentation-degeneration in man and animals may have a negative outcome on fertility. In uniparous animals it results in decreased conception rate while in multiparous species number of offspring per litter is decreased. This parameter is not associated with the sperm motility, its morphologic characteristics, nor can be compensated with increasing of spermatozoa number per dose.

A semen quality of 39 boars was tested in three-month intervals. The potential of the SCSA integrity was assessed in 532 farrowing (8 038 piglets). Boars were divided into group A (n = 33, the SCSA damage < 15%) and group B (n = 5, SCSA damage ≥ 15%).

Total sperm motility was higher in group B (80.77 ± 8.79 vs. $73.73 \pm 15.51\%$, $P < 0.05$) but there was no difference between groups A and B in progressive sperm motility ($34.80 \pm 9.77\%$ vs. $36.53 \pm 6.30\%$). Pregnancy rate (78.66% vs. 72.41% , $P = 0.018$) and total number of piglets per litter (14.79 vs. 13.76 ; $P = 0.0013$) showed a significant and very significant difference, respectively.

We were able to conclude that SCSA appears to be valuable tool in identifying boars with lower fertility and lower litter size.

Key words: boar, fertility, SCSA.

**PRIMENA PCR METODE U DIJAGNOSTICI POBAČAJA KOD
GOVEDA IZAZVANIH SA *NEOSPORA CANINUM***

***USAGE OF PCR IN DIAGNOSIS OF NEOSPORA CANINUM INDUCED
ABORTIONS IN CATTLE***

**Cvetojević Đorđe, Kureljušić Branislav, Jezdimirović Nemanja,
Radanović Oliver, Jakić-Dimić Dobrila,
Veljović Ljubiša, Ivetić Vojin**

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Vojvode Toze 14, Beograd

Kratak sadržaj

Protozoa *Neospora caninum* se smatra jednom od najznačajnijih uzročnika pobačaja goveda širom sveta. Goveda inficirana sa *N. caninum* najčešće abortiraju tokom petog i šestog meseca graviditeta mada su mogući i drugi ishodi infekcije: rana embrionalna smrt, mumifikacija fetusa, rađanje mrtvorodne, slabo vitalne ili klinički zdrave ali perzistentno inficirane teladi. U ovom radu opisujemo slučaj farme koja ima oko 100 grla svih kategorija goveda na kojoj su u periodu od godinu dana učestali problemi nakon potvrđivanja steonosti (abortusi, mrtvorodena i slabo vitalna telad). Radi dijagnostičkog ispitivanja uzročnika pobačaja dostavljeno je 13 krvi krava, dve posteljice, jedan pobačeni fetus u starosti od 45 dana i jedno mrtvorodeno tele (starosti oko 250 dana). Uzorci krvi su ispitani serološki na uobičajene abortogene uzročnike (BVD, IBR i Šmalenberg virus, bruceloza, leptospiroza i Q groznica). Uzorci tkiva posteljice, pobačenog fetusa i mrtvorodenog teleta su ispitani bakteriološki zasejavanjem na odgovarajuće hranljive podloge i inkubiranjem 24 do 48 sati u aerobnim, mikroaerofilnim i uslovima sa 10% CO₂ i PCR metodom na prisustvo genoma BVD, IBR i Šmalenberg virusa i *N. caninum*. Mozak, srce i jetra mrtvorodenog teleta su uzorkovani za patohistološka ispitivanja. Rezultati seroloških ispitivanja su bili negativni. Bakteriološki je iz tkiva jedne posteljice izolovan *Histophilus somni*. PCR metodom je dokazan genom *N. caninum* u svim ispitanim uzorcima tkiva. Iz organa mrtvorodenog teleta je pored *N. caninum* dokazan i genom virusa BVD-a. U patohistološkim preparatima bojenim hematoksilin-eozinom nisu ustanovljene patohistološke promene karakteristične za *N. caninum*.

PCR predstavlja metodu sa najboljom osetljivošću i specifičnošću za dijagnostiku *N. caninum*. Primenom PCR-a moguće je dokazati genom *N. caninum* i u uzorcima koji su nepodesni za druge vidove ispitivanja (mumificirani,

autolitični). Ovo je prvi slučaj dokazivanja genoma *N. caninum* u tkivima placente i organa mrtvorodene teladi u Srbiji.

Ključne reči: *Neospora caninum*, pobačaji, goveda.

Summary

Protozoan *Neospora caninum* is considered as one of the major causes of bovine abortions worldwide. Abortions in infected cattle occurs mostly during fifth and sixth month of pregnancy although other outcomes of infection are possible: early embryonic death, fetal mummification, stillbirth, giving birth of weak, avital calves or clinical healthy but persistently infected calves. Here we describe a case of farm with about 100 livestock at which in period of one year became frequent problems after confirming pregnancy (abortions, stillbirths, avital calves). Blood of 13 cows, two placentas, aborted embryo (aged 45 days) and stillborn calf (aged 250 days) were submitted for diagnostic examination of causes of abortions. Blood samples were tested serologically to the common infectious causes of abortion (BVD, IBR and Schmallenberg virus, brucellosis, leptospirosis and Q fever). Samples of placentas tissue, aborted embryo and stillborn calf were inoculated on corresponding medium and incubated 24 – 48 hours under aerobic, microaerophilic and 10% CO₂ conditions for bacteriological examination and by PCR for the presence of the genome of BVD, IBR and Schmallenberg virus and *N. caninum*. Brain, heart and liver of stillborn calf were sampled for histopathological examination. Results of serological tests were negative. *Histophilus somni* was isolated bacteriological from tissue of one placenta. *N. caninum* genome was proven in all tested tissue samples by PCR. Beside *N. caninum*, genome of BVD virus was also detected in organs of stillborn calf. Histopathological examination of hematoxylin-eosin stained samples revealed no pathomorphological changes characteristic for *N. caninum*.

PCR is a method with best sensitivity and specificity for diagnosis of *N. caninum*. Using PCR, it is possible to prove genome of *N. caninum* in samples that are unsuitable for other kinds of testing (mummified, autolysed). This is the first case of detecting genome of *N. caninum* in placental tissues and organs of stillborn calves in Serbia.

Key words: *Neospora caninum*, abortions, cattle.

**MIKROBIOLOŠKA ANALIZA TEČNOG AZOTA IZ KONTEJNERA ZA
SKLADIŠTENJE DUBOKO ZAMRZNUTOG SEMENA BIKOVA**

***MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF LIQUID NITROGEN CONTAINERS FOR
STORAGE OF BOVINE FROZEN SEMEN***

Nedić Svetlana, Vakanjac Slobodanka, Đurić Miloje, Maletić Milan

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Kratak sadržaj

Duboko zamrznuto seme bika ima značajnu ulogu u veterinarskoj biotehnologiji, omogućavajući dugoročno čuvanje, kao i nacionalni i internacionalni transport. Nakon tehnološke obrade uzorci semena bika se zamrzavaju u tečnom azotu na temperaturi - 196°C, skladište u kontejnere, odakle se prema potrebi distribuiraju do veterinarskih stanica na terenu. Upotreba potpuno sterilnog tečnog azota je ograničena na farmaceutsku industriju, dok je u tečnom azotu za komercijalne svrhe moguće očekivati nalaz ubikvitarnih mikroorganizama. Kontaminacija tečnog azota može nastati i tokom skladištenja, transporta, prilikom otvaranja kontejnera kada se iznad para tečnog azota stvaraju mali kristali leda sa visokim elektrostatičkim nabojem, koji mogu zarobiti mikroorganizme vazduha koji zatim padaju u kontejnere. Tečni azot tako može postati adekvatna sredina u kojoj se bakterije, virusi, kvasaci i spore gljivica mogu održati dugi niz godina. Istraživanja u ovoj oblasti su ukazala na niz potencijalnih kontaminenata, ali su se prevashodno bavila kontaminacijom uskladištenih uzoraka, dok je uloga tečnog azota kao potencijalnog vektora infektivnih agenasa između laboratorija na nacionalnom i internacionalnom nivou, kao i mogućnost unošenja patogena u nove sredine ovim putem slabo razmatrana. Prema literaturnim podacima mikroorganizmi koji najčešće kontaminiraju tečni azot su *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenothermophomonas maltophilia*, koagulaza negativne stafilokoke, α -hemolitičke streptokoke i drugi. Cilj rada bila je mikrobiološka analiza tečnog azota u kontejnerima za skladištenje i čuvanje duboko zamrznutog semena bika.

Ključne reči: tečni azot, kontaminacija, mikroorganizmi.

Summary

Bovine frozen semen plays a significant role in veterinary biotechnology, enabling long-term storage, as well as national and international transport. After technological processing semen samples freezing in liquid nitrogen at a temperature of -196°C , stored in containers, where the need to distribute the veterinary field stations. The use of fully sterile liquid nitrogen is limited to the pharmaceutical industry, while in liquid nitrogen for commercial purposes may be expected finding ubiquitous microorganisms. Contamination of liquid nitrogen may occur during storage, transport, while opening containers when the vapor above the liquid nitrogen creates small ice crystals with a high electrostatic charge, which can trap airborne microorganisms then fall into the container. Liquid nitrogen can thus become a proper environment in which bacteria, viruses, yeast, and fungal spores can maintain for many years. Research in this area has indicated on a number of potential contaminants, but they are primarily focused on contamination of stored samples, whereas the role of liquid nitrogen as a potential vector of infectious agents between laboratories at national and international levels, as well as the possibility of the introduction of new pathogens in the environment through poorly considered. According to the literature microorganisms that commonly contaminate liquid nitrogen, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Stenothermophomonas maltophilia*, coagulase-negative staphylococci, α -hemolytic streptococci and others. The aim of this study was to microbiological analysis of liquid nitrogen containers for storage of bull semen.

Key words: liquid nitrogen contamination, microorganisms.

Uvod

Konzerviranje sperme bika dubokim zamrzavanjem na -196° je tehnološki postupak koji omogućava dugoročno čuvanje, kao i transport semena na neograničene udaljenosti, bez većih gubitaka u kvalitetu i ispravnosti. Osnovno pravilo pri čuvanju i transportu duboko zamrznutog semena je da kontejneri uvek budu dovoljno puni, a seme potopljeno u tečnom azotu. Imajući u vidu da tečni azot stalno isparava (1l tečnog azota transferiše u 600l gasa) neophodno je često dopunjavanje tečnog azota u kontejnere. Upotreba sterilnog tečnog azota je ograničena na farmaceutsku industriju, dok je u tečnom azotu za komercijalne svrhe moguć nalaz mikroorganizama. Prema literaturnim podacima to su uglavnom ubikvitarni mikroorganizmi spoljašnje sredine, mada je zabeležena izolacija nozokomijalnih patogena ljudi, kao što su *Acinetobacter baumannii* i *Chrysenomonas luteolaa* (Morris, 2005). Kontaminacija tečnog azota mikroorganizmima spoljašnje sredine najčešće nastaje iz vazduha, kada prilikom otvaranja kontejnera dolazi do turbulencije i mešanja gasa azota sa vazduhom.

Takođe, unos mikroorganizama je moguć i preko nesterilnih spoljašnjih površina uzoraka koji se skladište, pincetama za vađenje i pomeranje uzoraka, kao i dopunjavanjem kontejnera kontaminiranim tečnim azotom.

Cilj rada bila je mikrobiološka analiza tečnog azota u kontejnerima kojima je duboko zamrznuto seme bika dopremano u Laboratoriju za mikrobiologiju i citologiju Katedre za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje.

Materijal i metode

Ukupno je ispitano 35 uzoraka. Uzorci za mikrobiološku analizu su uzimani sterilnim brisevima, uranjanjem u čašice ispunjene tečnim azotom, u kojima su uskladištene pajete sa duboko zamrznutim semenom bika. Nakon obogaćenja u hranljivom bujonu (24h na 37°C), uzorci su zasejavani na čvrste podloge (krvni agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, MacConkey agar i Sabouraud dekstrozni agar). Ploče su inkubisane u aerobnim uslovima na 37°C, 24-48h (Sabouraud dekstrozni agar, 3-5 dana). Bakterijski sojevi dobijeni u čistim kulturama presejavanjem, metodom iscrpljivanja na čvrstim podlogama, dalje su ispitivani na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih osobina. Kao test za potvrdu, u postupku identifikacije primenjivan je Microgen ID (Camberley, U.K).

Rezultati i diskusija

Rezultati mikrobiološke analize tečnog azota su potvrdili prisustvo mikroorganizama u 21 od 35 uzoraka, a identifikovani su *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Citrobacter diversus/Citrobacter koseri*, *Proteus mirabilis* i *Aspergillus spp.*

Izolovani mikroorganizmi su uglavnom oportunistički patogeni vrlo rašireni u prirodi, koji kod pacijenata sa oslabljenom imunološkom odbranom mogu dovesti do infekcija. *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffii* najčešće se navode kao uzročnici nozokomijalnih (intrabolničkih) infekcija ljudi, dok su infekcije životinja ovim mikroorganizmima slabo opisane u literaturi. Pored toga što se u humanoj medicini pominje kao nozokomijalni patogen, *Citrobacter diversus* se navodi i kao uzročnik meningitisa novorođenčadi, dok je u veterinarskoj medicini poznat kao uzročnik mastitisa krava. *Proteus mirabilis* poznat je kao uzročnik infekcija urinarnog trakta, zapaljenja spoljašnjeg ušnog kanala pasa i mačaka, endometritisa i mastitisa krava. Plesni iz roda *Aspergillus* su veoma raširene u prirodi, a redovno se nalaze na koži i sluznicama čoveka i životinja. (Naglić i sar., 2005).

Iako je temperatura tečnog azota -196°C, smatra se da je moguća kontaminacija uzoraka uskladištenih u tečnom azotu ukoliko nisu propisno zapečaćeni. U radu Piasecka-Seratin (1972) prvi put je opisana kontaminacija uzoraka duboko zamrznutog semena bika u toku 2h nakon smeštaja u tečni azot eksperimentalno kontaminiran sa *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

Visok nivo kontaminacije sedimenta leda tečnog azota u kontejnerima za skladištenje humanih embriona, opisao je Morris (2005). Autor navodi da su bakterije izolovane iz svih ispitivanih uzoraka, a plesni iz 9 od 10 uzoraka, pri čemu su identifikovani *Acinetobacter baumannii*, *Micrococcus spp*, *Chrysenomonas luteola*, *Klebsiella oxytoca*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Weaksella virosa* i nehemolitične streptokoke.

Ispitivanje koje su sproveli Bielanski i sar. (2003) ukazalo je na bakterijsku kontaminaciju 69% uzoraka tečnog azota i 62% uzoraka duboko zamrznutog semena iz kontejnera koji su bili u upotrebi 6-35 godina. Iz tečnog azota izolovani su i identifikovani *Staphylococcus auricularis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus capitis*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Bacillus pumilus*, *Eikenella corrodens* i *Aspergillus spp*. Iz uzoraka duboko zamrznutog semena uskladištenih u tečnom azotu, autori navode izolaciju *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus sciuri*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Morganella morgani*, *Gemella morbillorum*, *Citrobacter koseri*, *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus sphaericus*, *Aspergillus spp.*, *Photobacterium damsel*, *Corynebacterium spp.*, *Ralstonia pickettii*. Nedavno, Vakanjac i sar. (2013) pregledom 351 uzorka duboko zamrznutog semena bika izolovali su u čistoj kulturi *Citrobacter freundii* u 5, i *Candida albicans* u 9 uzoraka, dok su ostali uzorci bili slobodni od mikroorganizama.

Fountain i sar. (1997) naveli su izolaciju *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Paecilomyces*, α -hemolitičnih streptokoka, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium*, koagulaza negativnih stafilokoka iz tečnog azota za skladištenje matičnih ćelija hematopoeze.

Zaključak

Mikrobiološkom analizom tečnog azota iz kontejnera za skladištenje duboko zamrznutog semena bika, potvrđeno je prisustvo mikroorganizama koji uspešno preživljavaju niske temperature tečnog azota. Imajući u vidu njihov potencijalni patogeni efekat, potrebno je sprovesti mere kako bi se kontaminacija tečnog azota smanjila na najmanju moguću meru, a samim tim i mogućnost kontaminacije uskladištenih uzoraka, kao i unos patogena u nove sredine.

Literatura:

1. Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. 2003, Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*;46(2):146–52.
2. Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, Uhl L, Wheeler C, 1997 Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*;37(6):585–91.

3. *Morris Gj.* 2005 The origin, ultrastructure and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology*;50:231-8.
4. *Piasecka-Serafin M.* 1972, The effect of the sediment accumulation in containers under experimental conditions on the infection of semen stored directly in liquid nitrogen (-196°C). *Bulletin de l'Academie polonaise des sciences Series des sciences biologique*;20:263-7.
5. *Vakanjac S, Pavović M, Nedić S, Pavlović V, Magaš V, Maletić M, Đurić M,* 2013, Isolation of *Candida albicans* and *Citrobacter freundii* from deep frozen semen of bulls, XIII Middle European Buiatric's Congress, 5-8 June, , pp. 182-186, Belgrade, Serbia
6. *Naglić T, Hajsig D, Madić J, Pinter Lj,* 2005, *Veterinarska mikrobiologija*, Zagreb, 283-6

INDEKS AUTORA

Atanasov Branko: 113

Bajcsy Cs. Á.: 3

Barna Tomislav: 153, 165, 177

Čitaković Vladimir: **171**

Ćupić Vitomir: 153

Cvetojević Đorđe: 169, **179**

Došen Radoslav: **155**, 167

Dovenski Toni: **113**

Dražić Mirko: 165

Đurić Miloje: 81, 137, 171, 181

Erdeljan Mihajlo: 165

Etinski Novak: 165

Folnožić Ivan: 125

Fratrić Natalija: **57**, 69

Gereš Darko: **39**, **147**

Grizelj Juraj: **125**

Gvozdić Dragan: 57, **69**

Horváth A.: 3

Ivetić Vojin: 179

Jakić-Dimić Dobrila: 169, 179

Jezdimirović Nemanja: 179

Jovičin Milovan: **165**

Karen A.: 3

Kovačević Mira: 165

Kureljušić Branislav: 169, 179

Lazarević Miodrag: 153, 177

Magaš Vladimir: **81**, 137

Maletić Milan: 81, **137**, 171, 181

Milanov Dubravka: 155, 167

Milovanović Aleksandar: **153**, 165, 177

Milovanović Branko: 153

Nedić Svetlana: 91, 101, **181**

Pavlović Miloš: 91, **101**

Pavlović Vojislav: 91

Petkov Vladimir: 113

Prka Igor: **157**

Prodanov-Radulović Jasna: 155, **167**

Pušić Ivan

Radanović Oliver: **169**, 179

Savić Božidar: 169

Szelényi Z.: 3

Szenci O.: **3**

Špoljarić Branimira: 39, 147

Trojačanec Plamen: 113

Urošević Miroslav: 167

Vakanjac Slobodanka: **91**, 101, 171, 181

Vasiljević Teodora: **177**

Veljović Ljubiša: 179

Vince Silvijo: 125, 179

Ževrnja Branimira: 125

Žutić Jadranka: 169

POKROVITELJ

MINISTARSTVO PROSVETE, NAUKE I TEHNOLOŠKOG RAZVOJA REPUBLIKE
SRBIJE

VELIKI SPONZORI

STOČARSKO VETERINARSKI CENTAR KRNJAČA
JAVNO PREDUZEĆE STOČARSKO VETERINARSKI CENTAR ZA REPRODUKCIJU I
V.O. VELIKA PLANA
VETERINARSKI INSTITUT REPUBLIKE SRPSKE "DR VASO BUTOZAN"

SREBRNI SPONZOR

KORVET-TEAM

SPONZORI

FISHCORP 2000
VETERINARSKI SPECIJALISTIČKI INSTITUT PANČEVO
BIOKOM PLUS
MARLOFARMA
KRKA FARMA
SUPERLAB
VELVET
ISV FEED&CONSULTING D.O.O.
BACO
GREENLAB
ALFAVET
VETERINARSKI SPECIJALISTIČKI INSTITUT ŠABAC
INSTITUT ZA HIGIJENU I TEHNOLOGIJU MESA
NAUČNI INSTITUT ZA REPRODUKCIJU I V.O. DOMAĆIH ŽIVOTINJA TEMERIN
PROVET
POULTS

