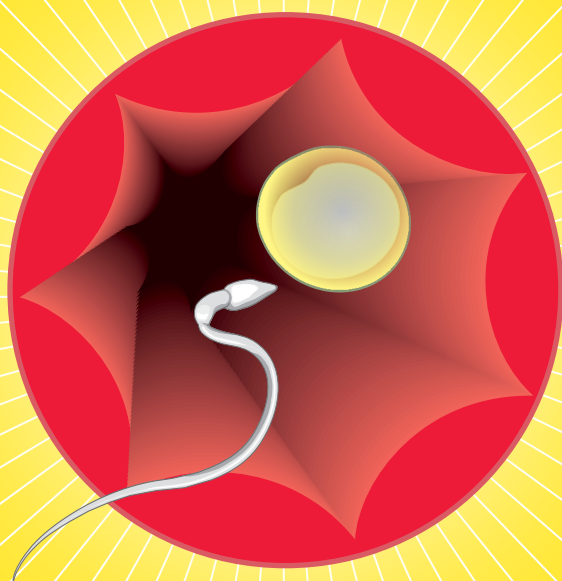




UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE

13. Naučni simpozijum
REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA
Zbornik predavanja



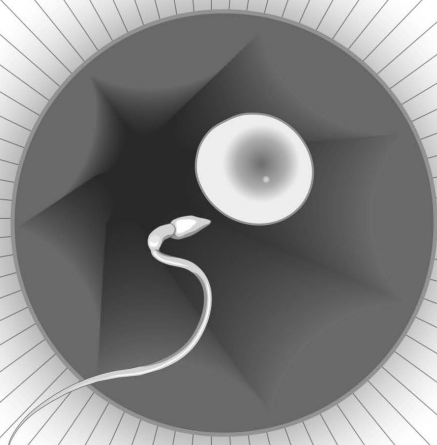
6 - 9. oktobar 2022.



UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

13. NAUČNI SIMPOZIJUM
REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA

6-9. oktobar 2022.



ZBORNİK PREDAVANJA

13. NAUČNI SIMPOZIJUM „REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA“
XIII SCIENTIFIC SYMPOSIUM „REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS“

– Zbornik radova / *Proceedings* –
Divčibare, 6-9. oktobar, 2022.

Organizatori / *Organized by*

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

Dekan Fakulteta veterinarske medicine
Dean of the Faculty of Veterinary Medicine
Prof. dr Milorad Mirilović

Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje
Department of Reproduction, Fertility and Artificial Insemination

Predsednik / *Chairmen*

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Sekretar / *Secretary*

Doc. dr Ljubodrag Stanišić

Organizacioni odbor / *Organizing Committee*

Prof. dr Dragan Gvozdić, Prof. dr Dragan Šefer, Dr sc. Željko Sladojević,
Dr sc. Dragan Knežević, Dr sc. Miloš Petrović, Prof. dr Janko Mrkun,
Mr sc. Saša Bošković, Dr sc. Dobrila Jakić-Dimić, Dr sc. Goran Jakovljević,
Prof. dr Savo Lazić, Dr sc. Zoran Rašić, Maja Gabrić, teh. sekretar

Naučni odbor / *Scientific Committee*

Prof. dr Miloš Pavlović, Prof. dr Danijela Kirovski, Doc. dr Vladimir Magaš,
Prof. dr Toni Dovenski, Prof. dr Csaba Arpad Bajcsy

Sekretarijat / *Secretariat*

Doc. dr Ljubodrag Stanišić, Maja Gabrić, teh. sekretar

Odgovorni urednik / *Editor in Chief*

Prof. dr Dragan Gvozdić

Lektura i korektura / *Proofreading*:

Prof. dr Dragan Gvozdić

Grafički dizajn i izrada korica / *Cover design*

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Grafička obrada / *Prepress*

Gordana Lazarević, teh. urednik

Izdavač / *Publisher*

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

Štampa / *Printing*

Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-52-3

SADRŽAJ

PLENARNI REFERATI	1
◆ Biljana T. Ljujić: Uticaj genetske osnove na određivanje „stranosti” organa ljudi i životinja na stadijumu faringule <i>Influence of the genetic basis on determining the „foreignness” of human and animal organs at the pharyngula stage</i>	3
◆ Radivoje Anđelković, Danijela Ristić, Verica Cvijetić, Nenad Todorov: Uticaj selekcije na reproduktivne parametre službenih pasa u Vojsci Srbije <i>Effect of selection on the Serbian Army official dog's reproduction parameters</i>	9
◆ Natalija Fratrić, Dragan Gvozdić, Slobodanka Vakanjac: Glavni zdravstveni problemi kod teladi u neonatalnom periodu <i>Major health problems in neonatal calves</i>	17
◆ Zoltán Szelényi: Factors predicting pregnancy losses in cattle <i>Predikcija gubitaka graviditeta kod krava</i>	31
◆ Adam Šuluburić, Dragan Gvozdić: Indukcija i sinhronizacija estrusa kod krava i test za ranu dijagnostiku graviditeta <i>induction and synchronisation of estrus in cows and early pregnancy test</i>	37
◆ Milica Stojković, Ljubomir Jovanović, Ivan Vujanac, Sreten Nedić, Dušan Bošnjaković, Slavica Dražić, Danijela Kirovski: Biološki markeri toplotnog stresa i mogućnost njihove upotrebe u predikciji proizvodno-reproduktivnih parametara kod visokomlečnih krava <i>Biological markers of heat stress and the possibility of their use in the prediction of production and reproductive parameters in high-yielding dairy cows</i>	47
◆ Janko Mrkun, Ožbalt Podpečan, Jernej Gačnikar: Most common mycotoxins and their effect on reproduction in cows <i>Najčešći mikotoksini i njihov efekat na reprodukciju kod krava</i>	57
◆ Goran Bačić, Tugomir Karadjole, Martina Lojkić, Miroslav Benić, Vladimir Mrljak, Josip Daud, Iva Bačić, Ivan Butković, Juraj Šavorić, Nikica Prvanović Babić, Neelesh Sharma, Josipa Kuleš, Anđelo Beletić, Nino Maćešić: Uzročnici subkliničkih mastitisa na farmama mliječnih krava u Republici Hrvatskoj <i>Diary cows subclinical mastitis in Republic of Croatia</i>	69
◆ Nino Maćešić, Tugomir Karadjole, Martina Lojkić, Marko Samardžija, Vladimir Mrljak, Silvijo Vince, Ivan Folnožić, Nikica Prvanović Babić, Branimira Špoljarić, Maša Efendić, Ivan Butković, Juraj Šavorić, Iva Bačić, Goran Bačić: Analiza zatečenog stanja na farmi mliječnih krava <i>Analysis of the existing situation on the dairy farm</i>	81
◆ Milutin Đorđević, Ljiljana Janković, Vladimir Drašković, Oliver Radanović, Nemanja Zdravković, Radislava Teodorović: Higijena muže kao faktor prevencije bolesti mlečne žlezde <i>Milking hygiene practices as a prevention factor in udder diseases</i>	89

◆ Maja Zakošek Pipan: Advances in artificial techniques in small animal reproduction <i>Napredak u asistiranim reproduktivnim tehnikama kod malih životinja</i>	101
◆ Toni Dovenski, Martin Nikolovski, Branko Atanasov, Florina Popovska Perčinić, Vladimir Petkov, Monika Dovenska, Ljupčo Mickov, Ljupce Kočoski, Silvijo Vince, Grizelj Juraj: Nova saznanja u reprodukciji ovaca <i>Recent advances in sheep and goat reproduction</i>	117
◆ Vladimir Magaš, Milena Babić, Slobodanka Vakanjac, Milan Maletić: Novi pristupi reproduktivnim problemima malih životinja New approaches to reproduction problems in small animals	129
◆ Miloje Đurić, Svetlana Nedić, Slobodanka Vakanjac, Ivan Nestorović, Miloš Pavlović, Milan Maletić, Ljubodrag Stanišić: Kolekcija ejakulata pastuva – pristupi i kritične tačke <i>Stallion semen collection – approaches and critical points</i>	137
KRATKA SAOPŠTENJA	143
◆ Dejan Perić, Radmila Marković, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Dragoljub Jovanović, Dragan Šefer: Efekti korišćenja dijetalnih vlakana u ishrani visokoproduktivnih krmača <i>Effects of using dietary fiber in nutrition of hyperprolific sows</i>	145
◆ Sonja Obrenović, Jovan Bojkovski, Radoslava Radovanović Savić, Živoslav Grgić, Slobodanka Vakanjac: Reproduktivni poremećaji goveda izazvani bakterijama roda <i>Leptospira</i> <i>Reproductive disorder of cattle caused by bacteria of the genus Leptospira</i>	155
◆ Jovan Bojkovski, Nemanja Zdravković, Slobodanka Vakanjac, Radiša Prodanović, Sveta Arsić, Sreten Nedić, Ivan Vujanac, Branko Angelovski, Ivan Dobrosavljević, Ivan Pavlović, Sonja Obrenović: Menadžment nerasta <i>Managment of boar</i>	165
INDEKS AUTORA	171
SPONZORI	173



INDUKCIJA I SINHRONIZACIJA ESTRUSA KOD KRAVA I TEST ZA RANU DIJAGNOSTIKU GRAVIDITETA

INDUCTION AND SYNCHRONISATION OF ESTRUS IN COWS AND EARLY PREGANCY TEST

Adam Šuluburić*, Dragan Gvozdić**

**Dr. vet. med, Msc, PhD, Ellie Laboratorija, Milvoki, SAD*

***Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,
Katedra za patološku fiziologiju, Beograd, R. Srbija*

Kratak sadržaj

Razvijanje novih programa indukcije i sinhronizacije estrusa u mlečnom govedarstvu je proces zasnovan na zavisnosti uspeha reprodukcije od nivoa reproduktivnih hormona. U osnovi većine protokola sinhronizacije je primena prostaglandina F_{2α} tj. manipulacija žutim telom. Sve se više posvećuje pažnja ulozi progesterona pre i tokom procesa sinhronizacije, pa sve do konačne potvrde graviditeta dva meseca nakon oplodjenja. Razvoj žutog tela i koncentracija progesterona u vezi su sa reproduktivnim ishodom tj. povratkom u estrus, embrionalnim mortalitetom i graviditetom, čime se progesteron pozitivnom spregom dovodi u vezu sa intenzivnom proizvodnjom proteina ranog graviditeta (EEP's), interferona Tau (IFN_T) i glikoproteina graviditeta (PAG's). Lutealna dinamika predstavlja bitan činilac, bilo da je to stvaranje uslova tokom sinhronizacije za ambijent sa niskom koncentracijom, ili po oplodjenju sa visokom koncentracijom progesterona, rezultirajući boljim reproduktivnim pokazateljima stanja farme. Visoka koncentracija progesterona u mleku tokom lutealne faze omogućava lako praćenje progesterona tokom sinhronizacije, kao i u danima nakon oplodnje, omogućavajući menadžmentu farme izbor odgovarajuće reproduktivne strategije. Detekcija progesterona metodom fluorescentne polarizacije (FPA) se izdvaja kao praktičan i lako izvodljiv test koji daje uvid u koncentracije progesterona u mleku u različitim reproduktivnim fazama krave i otvara mogućnost pravovremenog intervenisanja u okviru programa za poboljšanje plodnosti na farmi.

Ključne reci: fluorescentna polarizacija, progesteron, prostaglandin F_{2α}, sinhronizacija estrusa, žuto telo

Summary

The development of protocols for the induction and synchronization of estrus in dairy cattle and the success of such programs largely rely on achieving the

requisite levels of reproductive hormones that will enable good estrus and the development of a functional corpus luteum. The basis of most synchronization protocols is the application of prostaglandin F2 α , i.e., the manipulation with the corpus luteum. Attention is paid to the role of progesterone before and during the synchronization process, until the final confirmation of a stable state of pregnancy two months after fertilization. The development of the corpus luteum and the concentration of progesterone are related to the reproductive outcome, i.e., return to estrus, embryonic mortality or pregnancy, whereby progesterone is positively associated to intensive production of early pregnancy proteins (EEPs), interferon Tau (IFN- τ) and pregnancy glycoproteins (PAGs). Luteal dynamics is an important factor, whether it is creating conditions during synchronization for an environment with a low concentration, or after insemination with a high concentration of progesterone, it aids in better reproductive efficiency of the farm. The high concentration of progesterone in milk during the luteal phase enables easy monitoring of progesterone during synchronization, and later in the days after insemination, enabling farm management to choose an appropriate reproductive strategy. Progesterone detection using the fluorescence polarization method (FPA) stands out as an on-site and rapid test that provides insight on progesterone level in milk during different reproductive stages and results in timely acting within the program to improve reproduction efficiency.

Key words: *corpus luteum, fluorescence polarization, progesterone, prostaglandin F2 α , synchronization*

UVOD

U ovom radu pokušaćemo da iznesemo osnovna saznanja iz reprodukcije goveda kroz primenu procesa sinhronizacije estrusa i značaj praćenja koncentracije progesterona nakon veštačkog osemenjavanja (VO), a sve u cilju direktne primene u praktičnom radu. Namera rada nije da nameće bilo koji metod i praksu, već da se na jednostavan način prikaže jedan vid i način razišljanja u veterinarskoj praksi koji u zbiru sa znanjem i iskustvom veterinara praktičara može rezultirati boljim uspehom na polju reprodukcije goveda. Rad je vrlo uzan pregled koji ostavlja mogućnost da svako na osnovu svog rada i uslova na terenu primeni, proširi ili potpuno promeni prikazane načine rada, a u cilju unapređenja veterinarske prakse. U radu se kratko daju osnove ekonomike proizvodnje mleka, metoda sinhronizacije estrusa, raspoloživi biološki markeri u reproduktivnim procesima i na kraju model detekcije estrusa i problema u reprodukciji korišćenjem testa za održavanje progesterona u mleka krava.

Ekonomika mlečnih farmi u odnosu na reprodukciju

Težnja ka cilju da se dobije jedno tele po kravi godišnje glavni je zadatak svakog stručnjaka za reprodukciju u mlečnom govedarstvu. Rezultat je veći broj ženskih teladi što će omogućiti bržu zamenu i povećanje broja krava na farmi, ali je i direktno povezano sa količinom proizvedenog mleka. Kod negravidnih krava

tokom vremena proizvodnja mleka opada, uz gubitak profita koji je očekivan od nove laktacije i teleta. Ako se vreme između dva teljenja na farmi produži za 20 dana gubici mogu biti mereni u desetinama hiljada dinara po kravi čime se održivost farme za proizvodnju mleka dovodi u pitanje. Gubici se iskazuju kroz veću potrošnju hrane, smanjenu proizvodnju mleka, kao i isključenje iz proizvodnje krava koje nisu gravidne, a time se gubi i genetski potencijal ovih krava. Poznato je da velika proizvodnja mleka može uticati da krave s najboljim genetskim potencijalom imaju više problema sa reprodukcijom, što je uzrokovano većim metaboličkim zahtevima, ali primenom hormonskih metoda za kontrolu reprodukcije i dobrim upravljanjem farmom gubici uzrokovani visokom proizvodnjom u današnjem vremenu mogu se kontrolisati (Walsh i sar., 2011). Preduslov za uspeh reprodukcije uz primenu sinhronizacije estrusa zavistan je od zdravstvenog stanja stada, jer u svetu postoji trend pogoršanja reproduktivne efikasnosti uzrokovan različitim oboljenjima koja ne moraju biti direktno povezana sa reproduktivnim sistemom krave. Epidemiološka ispitivanja ukazuju da pojava različitih oboljenja utiču na negativan trend (Gvozdić i sar., 2013). Peripartalna oboljenja i opšte stanje zdravlja krava je bitan činilac uspešne reprodukcije. Način držanja krava, klima, ishrana itd. su jednako bitni faktori za uspeh u reprodukciji sa posebnim naglaskom na opšti zdravstveni status krava. Na primer, gubici zbog reprodukcije, mastitisa i oboljenja papaka izračunati u americkim dolarima su 80\$, 88\$ i 27\$, ali računajući i druga oboljenja, ukupna šteta se procenjuje najmanje do 300\$ po jednoj kravi godišne (De Kruif i sar., 2007). Ako su svi bitni činioци uzgoja i proizvodnje koji prethode primeni reproduktivnih strategija pod kontrolom, onda se može očekivati da primena naprednih strategija sinhronizacije, testiranje biomarkera graviditeta uz pravovremeno intervenisanje u odnosu na ishode primenjenih mera, poboljšaju reproduktivnu efikasnost mlečnih krava i proizvodne rezultate same farme.

Ovom prilikom preskočićemo vrlo bitan proces pripreme krava za naredni graviditet, a sve to radi zadržavanja fokusa i jednostavnosti pristupa bitnim temama i pitanjima ovog rada. Počevši od indukcije i sinhronizacije estrusa, odabira biomarkera i testa koji će pomoći u detektovanju i rešavanju izazova u reprodukciji krava, a zatim kroz prikaz modela testa i izabраниh problema, pokušaćemo da dođemo do odgovora o načinima kako se može poboljšati reproduktivna efikasnost na farmama mlečnih krava.

Sinhronizacija estrusa

Korist od programa sinhronizacije estrusa i fiksnog vremena osemenjavanja ogleda se u poboljšanju reproduktivne efikasnosti, ili konkretnije, postiže se manji broj veštačkih osemenjavanja po gravidnoj kravi (indeks osemenjavanja). I pored svih mera koje se primenjuju uspeh kod prvog VO je na nivou od 30-50% (Stevenson i sar., 2014). Razlog za ovakve rezultate (osim fizioloških ograničenja, epidemioloških incidenata, oboljenj itd.) treba tražiti i u lošoj detekciji estrusa i tzv. „tihom” estrusu. Sinhronizacija i fiksno vreme osemenjavanja su postali neizbežan faktor za uspeh na farmama krava, ali samo tehnički pristup tom procesu bez zainteresovanosti da se krave pojedinačno isprate i detektuje približno vreme ovulacije i osemenjavanja već na startu umanjuje uspeh reprodukcije.

Možda u načinu razmišljanja o procesu sinhronizacije treba imati na umu da je suštinski to proces sinhronizacije ovulacije i tu bi trebao biti cilj, a ne samo estrus za koji se kod „tihih“ estrusa ne zna ni kada je počeo, a ni kada će se završiti. U tom smislu je bitno poznavati krave koje vrlo često imaju svoj "program" koji ponavljaju iz ciklusa u ciklus. Takođe se mogu čuti komentari da su programi sinhronizacije za velike farme, što je pogrešno shvatanje. Programi sinhronizacije sa istim ciljem mogu se primeniti na JEDNOJ farmi ili na JEDNOJ kravi.

Hormonske metode za manipulaciju estrusnog ciklusa uglavnom se zasnivaju na primeni prostaglandina, gonadotropina, progestagena i estradiola (Gvozdić i sar., 2013). Za demonstraciju različitih mogućnosti sinhronizacije estrusa navodimo kao primer primenu prostaglandina i GnRH u *Ovsynch* protokolu, sa mogućnostima za njegovo poboljšanje i saznanjima o optimalnom vremenu za resinhronizaciju kod krava koje nisu ostale steone. Osnovna ideja rada nije da se izlistaju mnogobrojne varijante protokola za sinhronizaciju, već da se prikažu neki od razloga i varijanti za primenu protokola kod poznatog progesteronskog statusa krave tokom estrusnog ciklusa, što bi rezultiralo boljom reproduktivnom efikasnošću.

Ključni faktor za uspeh *Ovsynch* protokola je u odgovoru na uzastopne hormonske tretmane. Ukratko ćemo se osvrnuti na *Ovsynch* protokol i njegove modifikacije *Presynch* i *Double-Ovsynch* (tabela 1).

Tabela 1. Najčešći protokoli za sinhronizaciju estrusa kod krava (gonadotropni releasing hormon, GnRH)

<i>Ovsynch</i>: GnRH, za 7 dana PGF₂α, za 48h – 56h GnRH, za 8-20h VO fiksno
Popularan protokol zbog dužine trajanja od 10 dana
<i>Presynch</i>: PGF₂α, za 14 dana PGF₂α, za 12 dana početi sa primenom <i>Ovsynch</i>-a
Protokola traje 36 dan; sve krave su ranoj fazi estrusnog ciklusa na početku <i>Ovsynch</i> -a
<i>Double-Ovsynch</i>: GnRH, za 7 dana PGF₂α, za 72h GnRH, za 7 dana početi <i>Ovsynch</i>
Dvostruki <i>Ovsynch</i> traje 27 dana; sve krave su u ranoj fazi estrusnog ciklusa sa početkom drugog <i>Ovsynch</i> -a

Primena prostaglandina (PGF₂α) u protokolima sinhronizacije ukazuje na bitnu ulogu progesterona (P4). Štaviše, u analizi podataka iz 14 studija utvrđena je veza između koncentracije P4 i plodnosti kod *Ovsynch* protokola. Krave koje su imale srednji nivo P4 (0.5 do 6 ng/mL) kod prvog aplikovanja GnRH, visoku koncentraciju P4 kod aplikovanja PGF₂α (>1 ng/mL) i nisku koncentraciju P4 (<0.4 ng/mL) kod druge aplikacije GnRH, imale su bolji indeks osemenjavanja tj. broj osemenjavanja po gravidnoj kravi. Kod određenog broja krava ne dolazi do potpune lutealne regresije posle PGF₂α, a time ni do estrusa. Ako kod prve aplikacije GnRH u *Ovsynch* protokolu koncentracija P4 bude niska tada mlado žuto telo (*corpus luteum*) neće odreagovati potpunom regresijom posle aplikacije PGF₂α. Iako presinhronizacija značajno produžava broj dana protokola, ona ima opravdanje u tome što se omogućava da veliki broj krava bude u ranom diestrusu sa srednjom koncentracijom P4 na početku *Ovsynch* protokola (Carvalho i sar., 2018). Protokol *Double-Ovsynch* daje najbolje rezultate u novije vreme, a razloge možemo ta-

kođe tražiti u boljoj hormonskoj pripremi krava i dobro izbalansiraniom nivou P4. Ne treba zaboraviti da dvostruka aplikacija PGF₂α kod *Presynch*-a, kao i PGF₂α i GnRH kod *Double-Ovsynch*-a pre početka *Ovsynch* protokola implementiranim u njma, može imati i terapijski efekat u smislu izlječenja lakših oblika endometrita ili cističnih promena na jajnicima.

Biološki markeri važni za reprodukciju

Biološki markeri su merljivi pokazatelji stanja reproduktivnog sistema i obično su to steroidni ili proteinski hormoni. Do danas, testovi glikoproteina graviditeta (PAG's) i progesterona su komercijalno dostupni, dok su interferon-tau (IFNτ), proteini ranog graviditeta (EEP's) i estron sulfat prepoznati kao potencijalni markeri, ali u ovom trenutku nemaju komercijalnu primenu (Ott i sar., 2014).

Biološki marker važan za reprodukciju koji se detektuje trebalo bi da ispunjava sledeće kriterijume (Balharaet i sar., 2013):

1. poseduje specifičnu regulaciju tokom estrusa/graviditeta,
2. spoljni faktora poput hrane, okoline i lekova ne utiču značajno na biomarker,
3. sposobnost da odražava starost i održivost konceptusa,
4. prisutan je u lako dostupnim telesnim tečnostima kao što su serum, mleko, urin ili vaginalni iscedak,
5. prisutan je tokom dužeg vremena kako bi se pružila široka mogućnost postavljanja dijagnoze.

Na drugoj strani, idealni testovi za detekciju bioloških markera trebali bi da imaju sledeće karakteristike:

1. precizno identifikuje negravidne i gravidne krave,
2. jeftini su,
3. lako se mogu primeniti na samim farmama

Progesteron

Do danas, jedina pouzdana biotehnološka metoda za predviđanje estrusa i neuspele koncepcije je smanjenje koncentracije progesterona kod krava koje nisu koncipirale i vremenski okvir za primenu testa počinje oko 18 dana posle VO, gde nivo P4 dostiže najnižu vrednost tokom esterusa (Balharaet i sar., 2013).

Iako prisustvo progesterona u krvi ili mleku ne potvrđuje začeće, nedostatak progesterona može se koristiti kao metoda za otkrivanje neuspelog začeća i signaliziranje predstojeće ovulacije (Ott i sar., 2014). Uvećavanje broj krava na velikim farmama, smanjena ekspresija estrusa i potreba u radnoj snazi za detekciju estrusa daju prostor za primenu progesteronskog testa u mleku kao indirektnu metodu za identifikaciju krava u estrusu i dijagnostikovanje problema koji dovode do neuspešne koncepcije.

Uzorak za testiranje nivoa P4

Mleko je adekvatan uzorak za testiranje nivoa P4, jer uzorkovanje ne zahteva posebno obučene radnike. Važan činilac pri odabiru mleka kao uzorka je koncentracija progesterona koja je nekoliko puta veća u mleku u poređenju sa nivoom P4 u krvi.

Metoda fluorescentne polarizacije (FPA)

Osnovu za imunološki test fluorescentne polarizacije (FPA) čini kompetitivno vezivanje trejsera i progesterona iz uzorka sa antitelom za progesteron i emitovanje polarizovanih fotona sa fluorescirajućeg trejsera. Komponente potrebne za detekciju progesterona sa FPA su progesteronsko antitelo, trejser (progesteron konjugovan sa fluoresceinom) i uzorak mleka. Progesteron iz uzorka i trejser su u kompeticiji za vezivanje sa antitelom za progesteron (Hong i Choi, 2002). Nakon ekscitacije sa polarizovanom svetlošću, trejser emituje fotone u dve ravni: paralelnoj i vertikalnoj u odnosu na ravan ekscitacije i može se koristiti za kvantifikaciju sadržaja analita u uzorku (Nasir i Jolley, 1999).

Trejser vezan za antitelo emituje više polarizovanih fotona nego nevezani trejser. Šta više, osim emisije fotona, polarizacija se oslanja na dve karakteristike: rotaciju molekula u tečnosti i veličinu molekula. Brzina rotacije molekula u tečnosti ima inverznu vezu s veličinom molekula. Drugim rečima, ako je progesteron prisutan u uzorku, veći deo trejsera (MM manje od 1kD) ostaje nevezan, što rezultira brзом rotacijom i povećanjem poremećaja emitovanja svetlosti, rezultirajući niskom polarizacijom i nižom vrednosti izraženoj u milipolarizacionoj jedinici (mP) (Jameson i Croney, 2003.). Nasuprot tome, ako progesteron nije prisutan u uzorku, antitelo će se vezati za trejser u većem stepenu, što rezultira većim molekulom (150 kD) i uzrokuje sporiju rotaciju i višu vrednosti mP (Smith i Eremin, 2008).

Model rane detekcije negravidnih krava i reproduktivnih problema testiranjem progesterona u mleku

Negravidne krave, tihi estrus, nepravovremeno osemenjavanje, insuficijencija ili nedostatak žutog tela rezultiraju smanjenom reproduktivnom efikasnošću. Za ranu dijagnostiku ovih izazova metod izbora je progesteronski FPA test (P4 FPA) u mleku.

Instrument za očitavanje fluorescentne polarizacije *Sentry 300* i P4 FPA test kit proizvedeni su u **Biotehnika IVD** (Kraljevo, R. Srbija) i **Ellie LLC** (Milvoki, SAD).

Ispitivanje i testiranje mleka krava koje su indukovane i sinhronizovane *Ov-synch* protokolom sa jednim VO urađeno je u na farmi holštajn frizijskih krava u mestu Waterloo, Wiskonsin, SAD. Sa P4 FPA testom je detektovan nivo progesterona 19. i 22. dana posle fiksnog VO. Na ispitivanoj farmi se krave prate svakodnevno i ponovo se osemenjavaju ako se primeti estrus do 32 dana. Ultrazvučna

kontrola graviditet je rađena 32. dana i tom prilikom je utvrđeno da od svih krava čije mleko je testirano 39.4% je gravidno.

U analizi rezultata modela su utvrđena četiri problema koji se mogu rešavati primenom P4 FPA test i blagovremenim praćenjem krava.

Problem 1: Fiksno vreme osemenjavanja i vreme ovulacije

Postavlja se pitanje šta se može uraditi da se vremenski približe fiksno VO i vreme ovulacije, i da li se mogu identifikovati krave čija dužina estrusnog ciklusa različitā od proseka? Jedan od odgovora je u višekratnom osemenjavanju i primeni GnRH u vreme osemenjavanja! Iako ovo može dovesti do boljih rezultata, i dalje je postoji problem jer nismo sigurni koje krave imaju duži ili kraći ciklus. Testiranjem progesterona u mleku krava 19. i 22. dana posle VO dijagnostikuje se kada je počeo pad koncentracije progesterona kod krava koje nisu koncipirale. Sa pretpostavkom da većina krava ima standarnu dužinu ciklusa od 21 dan očekivano je da P4 bude nizak u oba merenja. Na osnovu ovih rezultata mogu se izvući korisni zaključci za svaku kravu pojedinačno, koji ne mogu sigurno potvrditi, ali mogu uputiti iskusnog veterinarskog praktičara koje krave imaju skraćen, regularan ili produžen estrusni ciklus. Time se dobija informacija koja se može upotrebiti kod sledećeg osemenjavanja, jer upućuju kako na krave koje bi se mogle osemeliti pre fiksnog termina osemenjavanja, tako i na krave koje treba da se osemene u dodatnom terminu posle fiksnog termina osemenjavanja.

Testiranjem mleka sa P4 FPA na farmi utvrdili smo da kod 65% krava koje nisu gravidne P4 nije nizak u jednom od dva merenja (19. ili 22. dana), što ukazuje na neku od tri mogućnosti:

- a. Estrusni ciklus kod 65 % negravidnih krava ne traje 21 dan,
- b. Kod 65 % krava pravo vreme za VO nije 72h posle PGF₂α već kod 12.5 % krava ranije, a kod 52.5% krava kasnije,
- c. Kombinacija prethodne dve mogućnosti.

Veterinar praktičar trebao bi prvo proveriti drugu mogućnost kao najverovatniju kod velikog procenta krava. Pravovremenim veštačkim osemenjavanjem uspeh se može značajno poboljšati.

Problem 2: Negravidne krave posle veštačkog osemenjavanja

Poznato je da je stopa koncepcije na farmama posle VO oko 40% posle prvog osemenjavanja. Iako prisustvo progesterona u krvi ili mleku ne potvrđuje začecē, nedostatak progesterona može se koristiti kao metoda za otkrivanje neuspelog začecā i signaliziranje predstojećē ovulacije. Veliki broj krava na farmi, smanjena ekspresija estrusa i veći zahtevi za radnom snagom koja bi se bavila otkrivanjem estrusa ističu progesteronski test kao pouzdanu indirektnu metodu za identifikaciju krava u estrusu.

Uzimajući u obzir predenost detekcije niske koncentracije progesterona u danima estrusa, u dva koraka se može poboljšati reproduktivna efikasnost. Pr-

vo, testiranjem odgovarajućeg uzorka krave na progesteron oko 20. dana posle osemenjavanja, to jest očekivanog povratka u estrus negravidnih krava, a zatim sprovođenje strategije da se sve detektovane krave ponovo osemene (Fricke i sar., 2017).

Rezultat testiranja je pokazao da je od ukupnog broja krava u testu kod 47.6% utvrđeno da imaju nizak nivo P4 19. i/ili 22. dana.

Problem 3: Tihi estrus

Znaci estrusa kao prirodnog sredstva za prepoznavanje predstojeće ovulacije predstavljaju poseban izazov kod kratkog ili neprimetnog estrusa (Roelofs i sar., 2010). Vidljivi znaci estrusu primećeni su kod samo 37% krava, ali se detekcija estrusa povećala do 75% kada su krave vizualno posmatrane po 30 minuta dva puta dnevno (Van Vliet i Van Erdenburg, 1996).

Od ukupnog broja testiranih negravidnih krava sa farme u Wisconsin-u, koje su 19. i/ili 22. dana imale nizak P4 kod 54% je primećen estrus i ponovo su osemenjavane, a kod 46% krava svakodnevnom opservacijom farme nije primećen estrus što ukazuje da većina njih ima tihi estrus.

Problem 4: Insuficijencija ili nedostatak žutog tela

Insuficijencija žutog tela je problem o kome se ne priča često, ali istraživanja ukazuju na njegov sve veći značaj. Prosečno kod 20-30% krava koje su detektovane kao negravidne ultrazvučnim pregledom 32. dana posle VO, žuto telo je bilo funkcionalno nerazvijeno ili je čak nedostajalo. Krave kojim nedostaje žuto telo i uđu u process resinhronizacije estrusa imaju oko 10% smanjenu stopu graviditeta (Ricci i sar., 2017).

Testiranjem krava sa farme u Wisconsin-u utvrđeno je da 11.1% od ukupnog broja negravidnih krava dana 19. i 22. je imalo nizak P4, a svakodnevnom opservacijom su primećeni estrusi kod tih krava koji se kreću u rasponu od 7. do 30. dana posle VO, što može ukazati na nedostatak ili insuficijenciju žutog tela zbog kombinacije nalaza učestalog ponavljanja estrusa i niskih koncentracija P4 na testu. Nijedna od ovih krava nije imala regularan estrusni ciklus oko 20 dana. Ove krave treba pratiti uz dodatna testiranja i kontrolu ultrazvukom na prisustvo ili odsustvo žutog tela.

ZAKLJUČAK

Ranom detekcijom krava koje nisu koncipirale omogućava se i detekcija krava sa tihim estrusom i ponovno VO krava čime se samnjuje dužina servis perioda (broj dana od partusa do koncepcije). Ovo je posebno bitno u toku letnjeg perioda kada je učestalost tihih estrusa veća, a stepen koncepcije kod krava niži. Otkrivanje krava sa kraćim ili dužim estrusnim ciklusom pomaže menadžmentu farme da odredi strategiju kojom će pristupiti rešavanju ovog problem. Nepravovremeno i nestručno osemenjavanje su činioci koji zavise od ljudskog faktora i okidač su za

slabiju reproduktivnu efikasnost. Povoljan trenutak za resinhronizaciju krava koje nisu koncipirale je na kraju metestrusa i početku diestrusa („srednji“ nivo P4 u cirkulaciji), iz čega se nameće ideja testiranja nivoa P4 kod krava oko 20. i 25. dana posle VO. Rezultati testiranja omogućavaju da se otkriju krave sa niskim nivoom P4 i ponovi VO ako su u estrusu, ali i da se 25. dana otkriju krave koje imaju insuficijenciju žutog tela i mogu se uključiti u proces rešavanja ovog problema. Na kraju sve krave koje su imale nizak nivo P4 oko 20. dana, a krajem metestrusa 25. dana imaju porast nivoa P4 mogu se uključiti u resinhronizaciju ako je koncentracija P4 dostigla srednji nivo, ne čekajući 32. dan i proveru statusa graviditeta ultrazvučnim pregledom. Ovim postupkom omogućava se ispunjenje uslova da *Ov-synch* resinhronizacija započne kada to najpovoljnije, tj. kada je koncentracija P4 na srednjem nivou. Poruka ovog rada je da se problemu reprodukcije i rešenjima može pristupiti na različite načine u zavisnosti od situacije, znanja, ali i profesionalne maštovitosti veterinara.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

LITERATURA

- Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK and Singh I, 2013, Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions, *The Scientific World Journal*, 2013.
- Carvalho PD, Santos VG, Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, 2018, Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 114, 165-72.
- De Kruif A, Opsomer, G, Noordhuizen JP, 2007, 10.1 Dairy herd health management: current state and perspectives, *Production Diseases In Farm Animals*.
- Fricke, PM, Wiltbank MC, Carvalho, PD, Giordano JO, 2015, Fertility programs to achieve high 21-d pregnancy rates in high-producing Holstein dairy herds. In *Proc Dairy Cattle Reprod. Counc Conf Dairy Cattle Reproduction Council*, Buffalo, NY, 15-27.
- Gvozdić D, Dovenski T, Stančić I, Stančić ., Božić A, Jovanovic I et al., 2013, Hormonal methods for estrous cycle manipulation in dairy cows, *Savremena poljoprivreda*, 62(3-4), 319-32.
- Hong JY and Choi MJ, 2002, Development of one-step fluorescence polarization immunoassay for progesterone, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(10),1258-62.
- Jameson DM, Croney, J.C., 2003, Fluorescence polarization: past, present and future. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(3),167-76.
- Nasir MS, Jolley, ME, 1999, Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2, 177-90.
- Ott TL, Dechow C, O'connor M., 2018, Advances in reproductive management: pregnancy diagnosis in ruminants. *Animal Reproduction (AR)*, 11(3), 207-16.
- Ricci A, Carvalho PD, Amundson MC, Fricke PM, 2017, Characterization of luteal dynamics in lactating Holstein cows for 32 days after synchronization of ovulation and timed artificial insemination. *Journal of dairy science*, 100(12), 9851-60.
- Roelofs J, Lopez-Gatiús F, Hunter RHF, Van Eerdenburg FJCM, Hanzen CH, 2010, When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects, *Theriogenology*, 74(3), 327-44.

15. Smith DS, Eremin SA, 2008, Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(5), 1499-507.
16. Souza A, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC, 2008, A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows, *Theriogenology*, 70(2), 208-15.
17. Stevenson JS, Hill SL, Nebel RL, DeJarnette JM, 2014, Ovulation timing and conception risk after automated activity monitoring in lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4296-308.
18. Van Vliet JH, Van Eerdenburg, FJCM, 1996, Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows, *Applied Animal Behaviour Science*, 50(1), 57-69.
19. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO, 2011, A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows, *Animal reproduction science*, 123(3-4), 127-38.

VSI Pančevo
Semex PK BB
Genetix International
Toplek
VSI Niš
Veterinarska stanica Đuravet
Primavet
Centralfarm
VSI Zaječar

CIP - Каталогизација у публикацији

Народна библиотека Србије, Београд

636.082(082)

636.09:618.19(082)

НАУЧНИ симпозијум Репродукција домаћих животиња (13 ; 2022 ; Дивчибаре)

Zbornik predavanja / 13. Naučni simpozijum Reprodukција domaćih životinja, Divčibare, 6-9. oktobar 2022. ; [organizatori Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu ... [et al.]] ; [organized by Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade ... [et al.]] ; [odgovorni urednik Dragan Gvozdić]. - Beograd : Fakultet veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2022 (Beograd : Naučna KMD). - II, 174 str. : ilustr. ; 25 cm

Radovi na srp., hrv. i engl. jeziku. - Tiraž 450. - Bibliografija uz većinu radova. - Summaries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-52-3

а) Домаће животиње -- Размножавање -- Зборници

COBISS.SR-ID 75826185