

Prisutnost neutralizacijskih protutijela za goveđi herpesvirus tip 1 i virus virusnog proljeva goveda u klinički oboljelih krava



Kristijan Škaro, Zvonimir Hajek, Sandra Cindrić i Nevenka Rudan*

Uvod

Goveđi respiratorni sindrom (GRS) jedan je od uzroka morbiditeta i mortaliteta u goveđoj populaciji što rezultira znatnim ekonomskim gubitcima (Ghram i sur., 1988.). Goveđi herpesvirus 1 (GHV1), virus virusnog proljeva goveda (VVPG) i goveđi parainfluenca-3 virus (PIV-3) su često etiološki čimbenici nastanka GRS (Potgieter, 1977.). Pretpostavlja se da više zaraznih uzročnika djeluje istovremeno, što bi moglo upućivati na njihovo sinergističko djelovanje (Rosenquist i sur., 1970., Rosenquist i sur., 1974., Irwin i sur., 1979., Slim i sur., 1983., Potgieter i sur., 1984.). Međutim, malo je poznato o njihovim kliničkim i imunološkim odgovorima na istovremene infekcije s više GRS virusa (Ghram i sur., 1988.).

Goveđi herpesvirus 1 spada u red *Herpesvirales*, porodicu *Herpesviridae*, potporodicu *Alphaherpesvirinae* i rod *Varicellovirus* (Davison i sur., 2009.). Prema antigenskim karakteristikama može se identificirati u dva različita, ali

blisko povezana podtipa: GHV-1.1 i GHV-1.2. Oba podtipa sposobna su inficirati respiratorni i genitalni trakt goveda, međutim, GHV-1.1 ima izraženiji tkivni tropizam prema respiratornom, a GHV-1.2 prema genitalnom traktu (Edwards i sur., 1991., Lojkić i sur., 2011.). GHV1 je uzročnik različitih kliničkih slika bolesti: zaraznog goveđeg rinotraheitisa (ZRG), zaraznog pustularnog vulvovaginitisa (IPV), zaraznog balanopostitisa (IBP), konjunktivitisa, encefalitisa, mastitisa, pobačaja, enteritisa, lezija interdigitalnog područja i smrtonosnih infekcija novorođenčadi (Gibbs i sur., 1977., Kahrs, 1977.).

VVPG spada u skupinu RNK virusa, porodicu *Flaviviridae*, rod *Pestivirus*, a može prouzročiti dvije različite kliničke slike: virusni proljev goveda (VPG) i bolest sluznica goveda (BSG). Postoje dva biotipa ovog virusa, citopatogeni (*cp*) i necitopatogeni (*ncp*). Oba biotipa virusa mogu prouzročiti bolest u

Kristijan ŠKARO, student, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Zvonimir HAJEK, dr. med. vet., Farma mliječnih krava, Feričanci, Hrvatska; Sandra CINDRIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Dugave, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Nevenka RUDAN*, dr. med. vet., redovita profesorica, (dopisni autor, e-mail: nrudan@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

goveda, no više od 95% infekcija VVPG-a, sve perzistentne infekcije i mnogi teški oblici bolesti, prouzročene su necitopatogenim biotipom (Kelling, 2004.). Citopatogeni biotip je uglavnom vezan za bolesti sluznica kod životinja koje su već perzistentno inficirane (PI) s necitopatogenim biotipom.

Postoji i dokaz da se *ncp* biotip virusa razvija mutacijom od *ncp* biotipa u PI životinji (Radostitis i sur., 2006.). Patogenost *ncp* tipa temelji se na sposobnosti prijelaza kroz placentu. Sposobnost *ncp* virusa da prijeđe posteljicu tijekom prvog tromjesečja gravidnosti može dovesti do teljenja imunotolerantne i PI teladi, koja potom tijekom života širi virus (Alsaad i sur., 2012.). PI životinje šire virus VPG-a svojim izlučevinama i sekretima. Iz organizma zaražene životinje izlučuje se: suzama, nosnim iscjekom, slinom, mlijekom, spermom, mokraćom i fecesom (Lanyon i sur., 2014.). Uzročnik u organizam dospjeva preko prirodnih otvora i sluznica u izravnom kontaktu životinja ili neizravnim dodirima (embriotransfer, umjetno osjemenjivanje, rektalni pregled, onečišćeni pribor). Nakon ulaska u organizam, umnaža se u epitelnim stanicama, a za očekivati je njegovu prisutnost u nepčanim tonzilama i sluznici nosa (predilekcijska mjesta). Odatle se širi na regionalne limfne čvorove. Virus se može slobodno krvlju širiti preko leukocita, osobito limfocitima i monocitima (Bruscke i sur., 1998.). Ovaj virus većinom izaziva: imunosupresiju, proljev, lezije oralne sluznice, blago povišenje temperature, pad mlječnosti, malformacije i smrt ploda, pregone i pobačaje. Smatra se da je imunosupresivni učinak virusa važan čimbenik u patogenezi mješovitih infekcija, jer dovodi do leukopenije i disfunkcije neturofila (Roth i sur., 1981.).

Ekonomski razvijene zemlje provode eradikaciju ovih zaraznih bolesti, dok se u našoj zemlji još uvijek ne provodi

sustavna kontrola u smislu prevencije i suzbijanja navedenih bolesti. U ovom radu je serološki pretraženo 50 krava s klinički manifestnim znacima GRS, i to na GHV1 i virus VPG/BSG-a, kako bismo ustanovili u kojoj mjeri su navedene zarazne bolesti prisutne na jednoj našoj velikoj farmi mlječnih krava. Primarni je cilj bio ustanoviti stupanj korelacije između pojedinih kliničkih znakova bolesti i vrste virusa kao etioloških čimbenika u njihovom nastanku.

Materijali i metode

Podrijetlo seruma

Pretraženo je 50 uzoraka krvnih seruma mlječnih krava holštajn-frizijske pasmine podrijetlom s farme od ukupno 1500 grla. Na farmi se ne provodi cijepljenje grla protiv zaraznog rinotraheitisa niti protiv VPG.

Uzorci krvi ciljano su uzeti samo od krava s izraženim kliničkim znacima bolesti te je uz krv uzeta i anamneza sporadično praćena kroz nekoliko mjeseci. Bolesne životinje pokazivale su izražene simptome u probavnom sustavu (proljev, otežano preživljavanje), dišnom sustavu (otežano disanje, kašalj, nosni iscjedak) te reproducijskom sustavu (pobačaji, avitalna telad, mrtvorodena telad, pregoni, aciklije, pad mlječnosti).

Svakoju je kravi izvađeno oko 10 mL krvi punkcijom *v. jugularis*. Uzorci krvi brzo su dostavljeni u laboratorij na daljnju obradu. U laboratoriju je pod sterilnim uvjetima ugrušak odvojen od stijenki epruveta, a potom su svi uzorci bili centrifugirani pri 1200 okretaja/min. kroz 10 min., radi odvajanja seruma. Po odvajanju svi su serumski pohranjeni u zamrzivač na -20 °C do pretraživanja.

Virus neutralizacijski test

U izvedbi virus-neutralizacijskog testa (VNT) kao antigeni uporabljeni su virus virusnog proljeva goveda (VVPG) soj NADL, umnožen u staničnoj kulturi

Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) sa 100 TCID₅₀ i goveđi herpesvirus tip 1 (GHV-1) soj Oregon također umnožen u staničnoj kulturi Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) sa 100 TCID₅₀.

U postupku VN-testa korišten je linijski stanični soj podrijetlom iz bubrega goveda (MDBK) uzgajan u hranjivom mediju Dulbesco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Ultraglutamin 1 (10 mL/500 mL DMEM-a) uz dodatak 5% fetalnog telećeg seruma (FTS) te penicilina, streptomicina i amphotericina B (1 mL). Prije izvedbe VN-testa svi uzorci seruma su inaktivirani u vodenoj kupelji pri 56 °C tijekom 30 minuta. Za GHV-1 pretragu, načinjena je serija dvostrukih razrjeđenja seruma, počevši od razrjeđenja 1:2 pa do 1:256, a za pretragu na VVPG serumi su početno razrijeđeni u omjeru 1:5, a kasnije u dvostrukim serijskim razrjeđenjima do 1:640. Za pojedino razrjeđenje svakog serumskog uzorka korištene su po dvije jažice ploče, a kao diluent koristio se DMEM. Na svakoj mikrotitracijskoj ploči, testiran je referentni pozitivni i referentni negativni serum. Na razrijeđene serume, dodana je jednaka količina virusa GHV-1 i VPG koja sadrži 100 TCID₅₀ (50 µL po jažici). Na svakoj mikrotitracijskoj ploči učinjena je proba radnog titra virusa. Nakon toga se ploče tijekom 60 minuta inkubiraju na 37 °C. Potom se dodaje stanična suspenzija (MDBK) pripremljene gustoće stanica 3×10^5 /mL u količini od 50 µL po jažici ploče. Ovakvo pripremljene ploče se inkubiraju na temperaturi od 37 °C u inkubatoru s 5% CO₂ tijekom narednih 4 do 5 dana. Rezultati se očitavaju mikroskopskom pretragom ploča na prisutnost citopatskog učinka (CPU) na staničnoj kulturi. VN-titar pojedinog uzorka seruma izračunava se Spearman-Kärber-ovom metodom. Linearna korelacija između GHV-1 i VVPG-a te uočenih kliničkih znakova, određena je programskim sustavom "OCTAVE 4.00".

Rezultati i rasprava

Virus-neutralizacijskim testom ukupno je pretraženo 50 uzoraka seruma mliječnih krava na prisutnost neutralizacijskih protutijela za goveđi herpesvirus tip 1 (GHV-1) te virus virusnog proljeva goveda / bolesti sluznica goveda (VVPG/VBSG).

Pretraženi uzorci seruma s ustanovljenim titrom neutralizacijskih protutijela prikazani su u grafikonu 1.

Svi uzorci seruma u kojima je titar protutijela $\geq 1:2$ smatraju se pozitivnima na virus IBR-a, a oni uzorci seruma u kojima je titar protutijela $\geq 1:5$ smatraju se pozitivnima na virus VPG-a. Seroprevalencija je izračunata kao omjer između broja ustanovljenih seropozitivnih uzoraka seruma i ukupnog broja pretraženih uzoraka seruma.

Na virus GHV-1 bila su pozitivna 47 seruma te seroprevalencija za taj virus iznosi 94%. Raspodjela seropozitivnih uzoraka za GHV-1 bila je: titar $<1:2$ (6%), 1:2 (4%), 1:3 (2%), 1:4 (4%), 1:6 (10%), 1:8 (6%), 1:11 (18%), 1:16 (12%), 1:23 (12%), 1:32 (4%), 1:45 (4%), 1:64 (6%), 1:91 (4%), 1:128 (2%), 1:181 (2%), $\geq 1:256$ (4%).

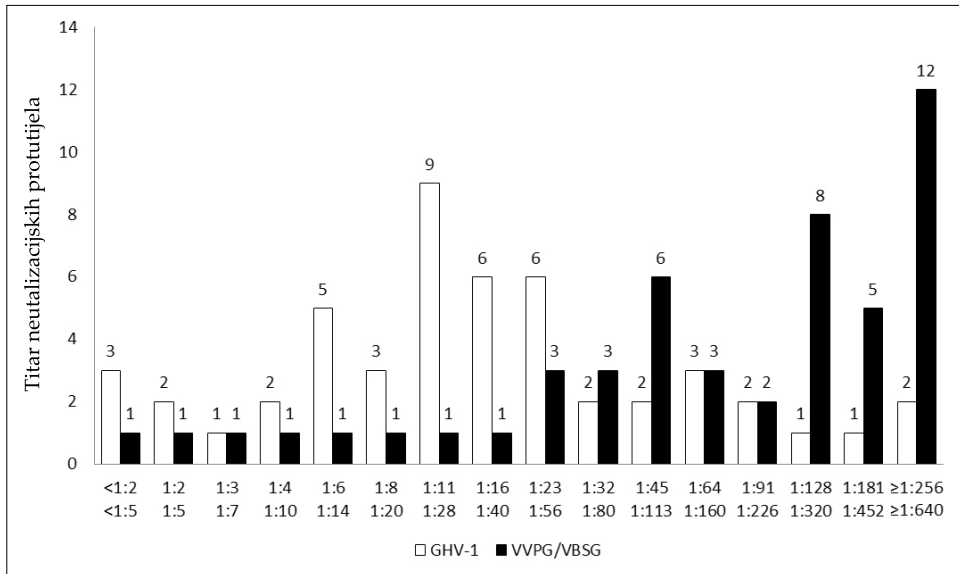
Na virus VPG/BSG bilo je pozitivno 49 seruma te seroprevalencija iznosi 98%. Raspodjela seropozitivnih uzoraka za virus VPG/BSG bila je: titar $<1:5$ (2%), 1:5 (2%), 1:7 (2%), 1:10 (2%), 1:14 (2%), 1:20 (2%), 1:28 (2%), 1:40 (2%), 1:56 (6%), 1:80 (6%), 1:113 (12%), 1:160 (6%), 1:226 (4%), 1:320 (16%), 1:452 (10%), $\geq 1:640$ (24%).

Faktori korelacije između pojedinog kliničkog znaka i vrste virusa prikazani su u tabeli 1.

Povezanost uzročnika zarazne bolesti i kliničkog znaka, primjenom linearne korelacije prikazana je u grafikonu 2.

Pozitivna korelacija je izražena između GHV-1 i mastitisa ($r=0,5646$), upale pluća ($r=0,5106$), otežanog disanja ($r=0,3351$) i iscjetka iz nosa ($r=0,4598$).

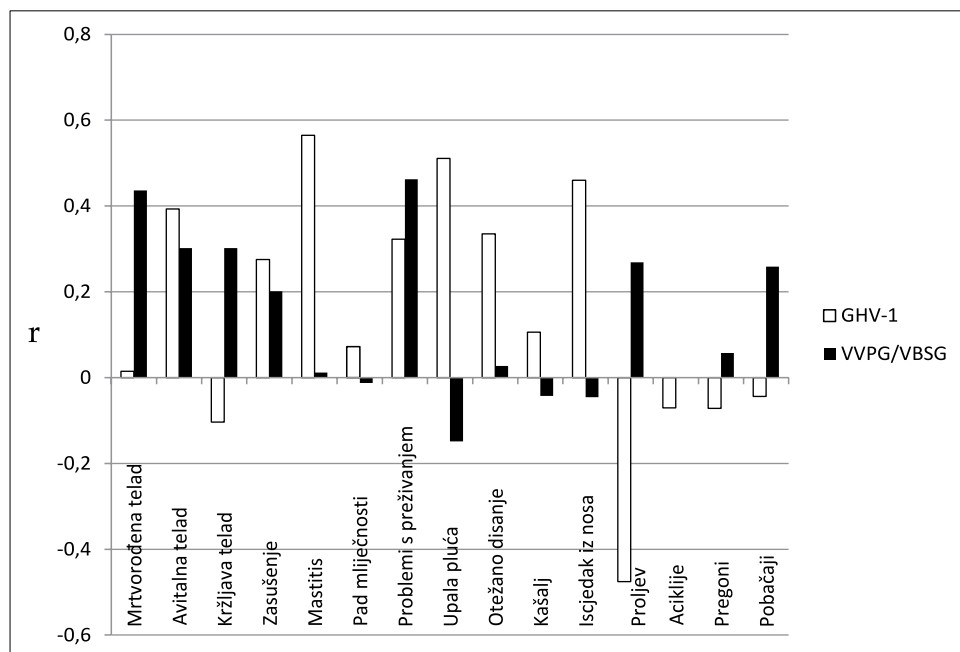
Izraženija pozitivna korelacija je uočena između VVPG/VBSG i



Grafikon 1. Relativni odnosi udjela neutralizacijskih protutijela za GHV-1 i VPG/VBSG

Tabela 1. Vrijednosti faktora linearne korelacije između GHV-1 i VPG/VBSG za pojedine kliničke znakove

Klinički znak	GHV-1	VPG/VBSG
Mrtvorodena telad	0,0149	0,4361
Avitalna telad	0,3932	0,3019
Kržljava telad	-0,1035	0,3019
Zasušenje	0,2751	0,2013
Mastitis	0,5646	0,0115
Pad mliječnosti	0,0724	-0,0125
Problemi s preživljavanjem	0,3226	0,4621
Upala pluća	0,5106	-0,1487
Otežano disanje	0,3351	0,0269
Kašalj	0,1060	-0,0428
Iscjedak iz nosa	0,4598	-0,0456
Proljev	-0,4754	0,2689
Aciklije	-0,0704	0,0013
Pregon	-0,0717	0,0574
Pobačaji	-0,0438	0,2587



Grafikon 2. Korelacija uzročnika zarazne bolesti i kliničkog znaka

mrtvorodjenja teladi ($r=0,4361$), krčljave teladi ($r=0,3019$), proljeva ($r=0,2689$) i pobačaja ($r=0,2587$).

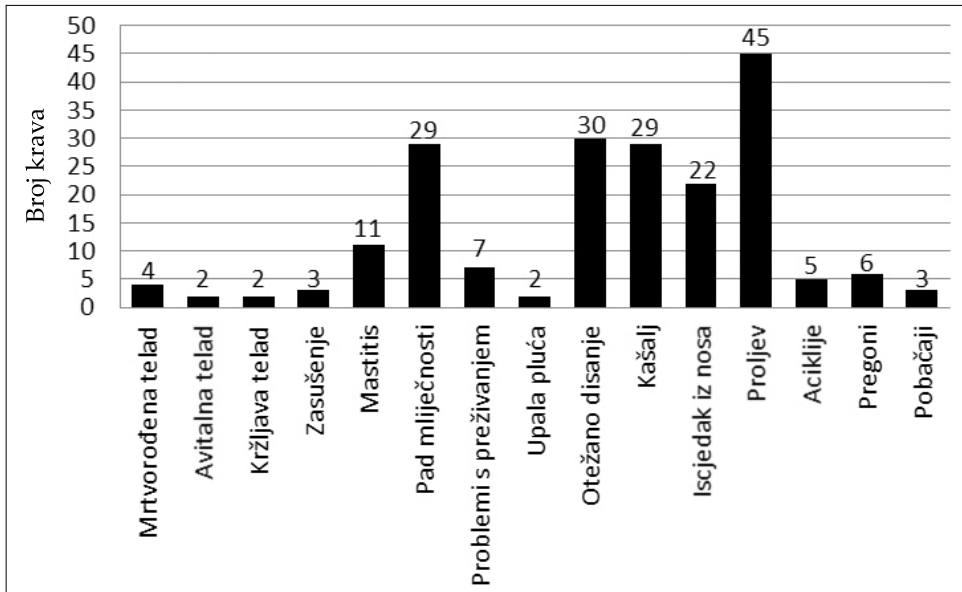
Podjednaku korelaciju oba virusa očituju prema avitalnosti teladi ($r=0,3932$ za GHV-1; $r=0,3019$ za VVPG/VBSG), zasušenju ($r=0,2751$ za GHV-1; $r=0,2013$ za VVPG/VBSG) i problemima s preživljavanjem ($r=0,3226$ za GHV-1, $r=0,4621$ za VVPG/VBSG).

Izraženija negativna korelacija postoji između GHV-1 i krčljivosti teladi ($r=-0,1035$) te proljeva ($r=-0,4754$), dok je negativna korelacija jednako tako izražena između VVPG/VBSG i upale pluća ($r=-0,1487$).

Grafikon 3 prikazuje frekvenciju uočenih kliničkih znakova u pretraženoj populaciji. Najzastupljeniji klinički znaci bili su proljev, otežano disanje, kašalj i pad mlječnosti.

U etiologiji zaraznih dišnih, probavnih i reproduktivnih bolesti u goveda uvijek sudjeluje više čimbenika. Budući

da su pretražene mlječne krave pokazivale simptome svih gore navedenih bolesti, bila je opravdana sumnja da se njihovi serumski uzorci pretraže, u prvom redu, na prisutnost protutijela za virus virusnog proljeva goveda i virus zaraznog rinotraheitisa goveda kao najučestalijih virusnih zaraznih bolesti goveda. VN-test kao dijagnostička laboratorijska metoda pokazuje visoki stupanj osjetljivosti i specifičnosti za navedene viruse (Kramps i sur., 1996.) i zbog toga je izabran za pretragu serumskih uzoraka oboljelih krava. Dobiveni rezultati serumskih uzoraka pokazali su da su mlječne krave podrijetlom s jedne velike farme, bile zaražene s jednim i drugim virusom u visokom postotku (94% s virusom ZRG-a i 98% s virusom VPG/BSG-a). Naravno da je ovaj podatak proizašao iz serološke pretrage onih krava koje su kroz dulje vrijeme bile klinički bolesne. U velikom broju seruma ustanovljena su protutijela i za jedan i drugi virus (92% slučajeva).



Grafikon 3. Prisutnost pojedinih kliničkih znakova bolesti u pretraženih krava

O prisutnosti precipitacijskih protutijela za VVPG/VBSG u populaciji goveda prvi je u našoj zemlji izvijestio Cvetnić i sur. (1967.), gdje je seroprevalencija iznosila 5,14%. Potom Madić i sur. (1989.) godine dokazuju seroprevalenciju za VVPG/VBSG u iznosu od 30% te za GHV-1 u iznosu od 27%.

Pojava virusnog proljeva goveda zabilježena je kao primarna infekcija na području nekoliko govedarskih uzgoja u Egiptu. Imunosupresivni učinak VVPG-a omogućio je sekundarne infekcije tih životinja s virusom ZRG-a i virusom parainfluenze 3 u goveda (PI 3). Uočene histopatološke promjene ukazivale su na degeneraciju i nekrozu alimentarnog trakta (Aly i sur., 2000.).

Seroepizootiološko istraživanje na prisutnost virusa ZRG-a i govedeg herpesvirusa tip 4 (GHV 4) na području Irana, pokazalo je da su neutralizacijska protutijela za VZRG-a široko rasprostranjena u govedoj populaciji u odnosu na GHV 4 i taj omjer iznosi 40% naprema 3% (Moakhar i sur., 2001.).

U uzgojima mliječnih krava na zapadnom području Turske, uočena su učestala preganjanja (od 3 do 11 puta) i serološki je dokazan virus VPG-a u 70% krava na području šest farmi (Gür, 2011.).

Seroprevalencija VVPG-a u spremištima za otkup mlijeka, iznosila je između 89,5% i 93,9% u uzgojima mliječnih krava na području Irana (Talebkhani Garoussi i sur., 2008.).

Istraživanje seroprevalencije i rizičnih čimbenika za pojavu virusnog proljeva goveda, provedeno je na 40 govedarskih farmi na području Meksika. Visoki rizik seroprevalencije uočen je na farmama koje su imale više od 100 grla i na onima koje su više nakupljivale krave iz drugih uzgoja (Solis-Calderon i sur., 2005.).

Seroprevalencija VZRG-a i VVPG-a u uzgojima tovne junadi u Urugvaju iznosila je 99% i 100% (Guarino i sur., 2008.).

U Irskoj je provedeno istraživanje o zastupljenosti ZRG-a i VPG-a u bikova koji se uzgajaju za pripust ili umjetno osjemenjivanje na farmama

mliječnih krava. Ustanovljeno je da su od 529 pretraženih bikova, dva bila seropozitivna na virus BVD-a (0,4%) te njih 87 (16,7%) seropozitivno na virus IBR-a. Zaključeno je da je kod kupljenih bikova tri puta veća vjerojatnost da će biti seropozitivni na virus BVD-a i četiri puta veća vjerojatnost da će biti seropozitivni na virus IBR-a, u odnosu na „štalske“ bikove (Martinez-Ibeas i sur., 2015.).

Na području četiriju farmi mliječnih krava u našoj zemlji istraživana je prisutnost infekcije s GHV-1 i VVPG/VBSG-a s obzirom na pojavnost reproduktivnih poremećaja i dokazana je u velikom postotku, tj. 85,8% za GHV-1 i 79,2% za VVPG-a (Biuk-Rudan i sur., 1999.).

Istraživanje seroprevalencije za virus IBR-a i BVDV-a na farmama mliječnih krava s reproduktivnim poremetnjama na dva područja u Sudanu, pokazalo je veliku proširenost i jednog i drugog virusa. Proširenost protutijela za virus IBR-a iznosila je 51,7%, a za BVDV 50,4% (Elhassan i sur., 2011.).

Provedeno seroepizootiološko istraživanje prisutnosti virusa IBR-a i BVDV u populaciji mliječnih krava na malim farmama na kojima se ne provodi cijepjenje, pokazalo je visoku seroprevalenciju za oba virusa. Prevalencija virusa IBR-a u 186 pretraženih uzgoja iznosila je 61% tijekom 2002. godine da bi se postupno smanjivala tijekom iduće dvije godine i dosegla razinu od 48%. Prevalencija za BVDV iznosila je 91% tijekom 2002. godine i opadala je do 72% u 2004. godini (Kampa i sur., 2009.).

Prevalencija ovih dviju bolesti ovisi o cijepljenju i veličini stada. Rezultati istraživanja u sjevernom dijelu Irske na prisutnost ZRG-a i VPG-a u uzgojima mliječnih i tovnih goveda koja nisu prethodno cijepljena, iznosila su 77,3% za IBRV i 98,4% za BVDV. Dobiveni rezultati su vodič za kontrolu ovih bolesti i provođenje eradikacijskih programa (Bosco Cowley i sur., 2014.).

Istraživana je povezanost između ZRG-a i pojave respiratornih te reproduksijskih poremetnji u gravidnih junica i krava na 103 mliječne farme. Zaključeno je da virus ZRG-a nije značajno povezan s pojavom akutnih respiratornih simptoma u pretraženih grla, ali je signifikantna povezanost između infekcije s virusom ZRG-a i reproduksijskih poremetnji u tih istih životinja (Raaperi i sur., 2012.).

U ovom radu je uočena značajna povezanost virusa VPG-a s mrtvorodenjima, kržljivostima, pobačajima, problemima s preživljavanjem i proljevom. Signifikantna je povezanost virusa ZRG-a s mastitisima i upalama pluća. Za oba virusa uočena je nesignifikantna povezanost sa zasušenjem, padom mliječnosti i kašljem.

Analiza sustava ranog otkrivanja pobačaja u mliječnih krava u Danskoj uključivala je epidemiološke i financijske aspekte. Istraživanje je provedeno na 570 većih uzgoja mliječnih krava. Pobačaji su najčešće prouzročeni brucelama, virusom IBR-a i BVDV. Smatra se da bi se broj pobačaja koji se kreće oko 23% mogao smanjiti na 0,3% zbog prihvaćanja preventivnih mjera (Carpenter i sur., 2006.).

Zbog navedenih zdravstvenih i financijskih problema, cijepjenje protiv navedenih zaraznih bolesti je prihvatljivo rješenje za naše uvjete, budući da se cijepjenje protiv ZRG-a i VPG-a provodi sporadično. Cijepjenje protiv VPG-a omogućuje prevenciju akutnih sistemskih infekcija i pojavu reproduktivnih poremećaja. Intranasalnim cijepljenjem mlade teladi moguće je osigurati interferenciju s majčinskim protutijelima i inducirati imunosnu memoriju koja perzistira 6-8 mjeseci (Griebel, 2015.).

Sažetak

U ovome istraživanju pretraženo je 50 uzoraka seruma mliječnih krava podrijetlom s farme s ukupno 500 grla, a na kojoj se ne provodi cijepjenje protiv ZRG-a i VPG-a.

Serumi su ciljano uzeti samo od krava koje su pokazivale kliničke znakove bolesti koji upućuju na infekciju s goveđim herpesvirusom 1 (GHV 1) i virusom virusnog proljeva goveda (VVPG). Serumski uzorci su pretraženi virus neutralizacijskim testom (VN-test) na prisutnost protutijela za navedene viruse. Na virus ZRG-a bilo je pozitivno 47 seruma te seroprevalencija za taj virus iznosi 94%. Na virus VPG/BSG-a bilo je pozitivno 49 seruma te seroprevalencija iznosi 98%. U velikom broju seruma ustanovljena su protutijela i za jedan i za drugi virus (92% uzoraka). Ustanovljena je povezanost vrste virusne infekcije s većinom kliničkih znakova, a naročito pojavnost ZRG-a s mastitisom i upalom pluća te VPG-a s mrtvorodenjem, kržljavošću, pobačajem, problemima s preživljavanjem i proljevom.

Gljučne riječi: *zarazni rinotraheitis goveda (ZRG), virusni proljev goveda (VPG), neutralizacijska protutijela*

Literatura

1. ALSAAD, K. M., Q. T. AL-OBAIDI and S. D. HASSAN (2012): Clinical, haematological and coagulation studies of bovine viral diarrhoea in local Iraqi calves. *Bulg. J. Vet. Med.* 15, 44-50.
2. ALY, N. M., G. G. SHEHAB and I. H. A. ABD EL-RAHIM (2003): Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. *Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22, 879-892.
3. BIUK-RUDAN, N., S. CVETNIĆ, J. MADIĆ and D. RUDAN (1999): Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 51, 875-881.
4. BOSCO COWLEY, D. J., D. A. GRAHAM, M. GUELBENZU, M. L. DOHERTY and S. J. MORE (2014): Aspects of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus herd-level seroprevalence and vaccination in dairy and beef herds in Northern Ireland. *Irish Vet. J.* 67, 18.
5. BRUSCHKE, C. J. M., K. WEERDMEESTER, J. T. VAN OIRSCHOT and P. A. VAN RIJN (1998): Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet. Microbiol.* 64, 23-32.
6. CARPENTER, T. E., M. CHRIEL and M. GREINER (2006): An analysis of an early-warning system to reduce abortions in dairy cattle in Denmark incorporating both financial and epidemiologic aspects. *Prev. Vet. Med.* 78, 1-11.
7. CVETNIĆ, S., E. TOPOLNIK and M. KRALJ (1967): Aetiology of infection of respiratory and digestive system of cattle. IV. Detection of neutralisation antibodies against bovine rinotracheitis virus. *Vet. arhiv* 37, 53-56.
8. DAVISON, A. J., R. EBERLE, B. EHLERS, G. S. HAYWARD, D. J. MCGEOCH, A. C. MINSON, P. E. PELLETT, B. ROIZMAN, M. J. STUDDERT and E. THIRY (2009): The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171-177.
9. EDWARDS, S., R. H. NEWMAN and H. WHITE (1991): The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br. Vet. J.* 147, 216-231.
10. ELHASSAN, A. M., M. A. FADOL and A. M. EL-HUSSEIN (2011): Seroprevalence of Bovine Herpes Virus-1, Bovine Herpes Virus-4 and Bovine Viral Diarrhea Virus in Dairy Cattle in Sudan. *Pakistan Vet. J.* 31, 317-320.
11. GHRAM, A., P. G. REDDY, J. L. MORRILL, F. BLECHA and G. C. MINOCHA (1988): Bovine Herpesvirus-1 and Parainfluenza-3 Virus Interactions: Clinical and Immunological Response in Calves. *Can. J. Vet. Res.* 53, 62-67.
12. GIBBS, E. P. J. and M. M. RWEYEMAMU (1977): Bovine herpesviruses. *Vet. Bull.* 47, 317-343.
13. GRIEBEL, J. P. (2015): BVDV vaccination in North America: risk versus benefits. *Anim. Health Res. Rev.* 16, 27-32.
14. GUARINO, H., A. NÚÑEZ, M. V. REPISO, A. GIL and D. A. DARGATZ (2008): Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev. Vet. Med.* 85, 34-40.
15. GÜR, S. (2011): Prevalence of bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus type 1 and 4 infections in repeat breeding cows in Western Turkey. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 48, 228-233.
16. IRWIN, M. R., S. MCCONNELL, J. D. COLEMAN and G. E. WILCOX (1979): Bovine respiratory disease complex: a comparison of potential predisposing and etiologic factors in Australia and the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 1095-1099.
17. LANYON, S. R., F. I. HILL, M. P. REICHEL and J. BROWNIE (2014): Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis: a review. *The Vet. J.* 199, 201-209.
18. LOJKIĆ, I., Ž. ČAČ, T. KEROS, T. BEDEKOVIĆ, J. BALATINEC and B. ROIĆ (2011): Phylogenetic analyses of bovine herpes virus 1 isolated in Croatia. *Vet. arhiv* 81, 299-306.
19. KAHRS, R. F. (1977): Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1055-1064.
20. KAMPA, J., S. ALENIUS, U. EMANUELSON, A. CHANLUN and S. AIUMLAMAI (2009): Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: Self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. *The Vet. J.* 182, 223-230.
21. KELLING, C. L. (2004): Evolution of Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccines. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 20, 115-129.

22. KRAMPS, J. A., B. PERRIN, S. EDWARDS and J. T. VAN OIRSCHOT (1996): A European inter-laboratory trail to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet. Microbiol.* 53, 153-161.
23. MADIĆ, J., S. CVETNIĆ, N. BIUK-RUDAN and B. LUGOVIĆ (1989): Antibodies to BRS, BVD, and IBR viruses in bovine sera in S. R. Croatia, S. F. R. Yugoslavia. *Vet. arhiv* 59, 233-238.
24. MARTINEZ-IBEAS, A. M., C. POWER, J. McCLURE and R. G. SAYERS (2015): Prevalence of BoHV-1 seropositive and BVD virus positive bulls on Irish dairy farms and associations between bull purchase and herd status. *Irish Vet. J.* 68, 28.
25. MOAKHAR, K. R., S. BOKAIE, M. A. AKHAVIZADEGAN, S. CHARKHKAR and M. MESHKOT (2001): Seroepidemiological Survey for Antibodies against Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Herpes 4 Viruses among Cattle in Different Provinces of Iran. *Arch. Razi Ins.* 52, 93-102.
26. POTGIETER, L. N. D. (1977): Current concepts on the role of viruses in respiratory tract disease of cattle. *Bovine Pract.* 12, 75-81.
27. POTGIETER, L. N. D., M. D. McCracken, F. M. HOPKINS and R. D. WALKER (1984): Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis in calves. *Am. J. Vet. Res.* 45, 687-690.
28. RADOSTITIS, O. M., C. C. GAY, K. W. HINCHCLIFF and P. D. CONSTABLE (2006): *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses*, 10th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1248-1275.
29. RAAPERI, K., S. BOUGEARD, A. ALEKSEJEV, T. ORRO and A. VILTROP (2012): Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 54, 4.
30. ROSENQUIST, B. D., J. E. ENGLISH, D. W. JOHNSON and R. W. LOAN (1970): Mixed viral etiology of a shipping fever epizootic in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 31, 989-994.
31. ROSENQUIST, B. D. and A. W. DOBSON (1974): Multiple viral infection in calves with acute bovine respiratory tract disease. *Am. J. Vet. Res.* 35, 363-365.
32. ROTH, J. A., M. L. KAEBERLE and R. W. GRIFFITH (1981): Effects of BVDV on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am. J. Vet. Res.* 42, 244-250.
33. SLIM, A. and M. ELAZHARY (1983): Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea viruses in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Can. J. Comp. Med.* 47, 18-22.
34. SOLIS-CALDERON, J. J., V. M. SEGURA-CORREA and J. C. SEGURA-CORREA (2005): Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Prev. Vet. Med.* 72, 253-262.
35. TALEBKHAN GAROUSSI, T. M., A. HAGHPARAST and H. ESTAJEE (2008): Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. *Prev. Vet. Med.* 84, 171-176.

Neutralising antibodies for bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in clinically infected cows

Kristijan ŠKARO, student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Zvonimir HAJEK, DVM, Farm of Dairy Cows, Feričanci, Croatia; Sandra CINDRIĆ, DVM, Veterinary Clinic Dugave, Zagreb, Croatia; Nevenka RUDAN, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

This study tested a total of 50 cow serum samples from a single dairy farm with 1500 animals. Tested cows were not vaccinated but showed clinical signs indicating BHV-1 infection and/or BVDV infection. Serum samples were tested with the virus-neutralization test for the presence of neutralising antibodies for the two mentioned viruses. The presence of BHV-1 antibodies was observed in 47 serum samples, therefore the seroprevalence for this virus was 94%. Antibodies for BVDV were found in 49 serum samples and the seroprevalence was

98%. Antibodies for both viruses (BHV-1 and BVDV) were found in 92% of serum samples. Connections were found between the sort of viral infection and the presented clinical signs. There was a correlation between BHV-1 and the occurrence of mastitis and pneumonia. Correlations were also found between BVDV and stillbirth, stuntedness, abortion, rumination issues and diarrhoea.

Key words: *infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine viral diarrhoea (BVD), neutralising antibodies*