

Patološke promjene i molekularna dijagnostika u goveda serološki pozitivnih na virus enzootske leukoze goveda u Republici Hrvatskoj



Pathological findings and molecular diagnostics in cattle serologically positive for bovine leukemia virus in Croatia

Vlahović, D., B. Šoštarić, B. Artuković, I.-C. Šoštarić-Zuckermann, M. Hohšteter, L. Medven Zagradišnik, D. Huber, D. Brnić, K. Severin, V. Benko, L. Jemersić, A. Jungić, G. Kompes, R. Beck, K. Branović Čakanić, K. Sokolić, A. Gudan Kurilj

40

Sažetak

Enzootska leukoza goveda (ELG) je kronična virusna zarazna bolest goveda koja je od velikog gospodarskog značaja zbog gubitaka uzrokovanih padom mliječnosti, povećanom stopom izlučenja iz stada, kraćim životnim vijekom i povećanom sklonosti sekundarnim bolestima. Cilj ovog istraživanja bio je u krava i junica serološki pozitivnih na virus ELG-a u Republici Hrvatskoj odrediti stadij infekcije, utvrditi prisutnost patoloških promjena u organima, dokazati provirusnu DNA u krvi, te odrediti sklonost sekundarnim bakterijskim i parazitskim infekcijama. Od 2015. do 2016. godine prikupljeni su uzorci krvi, 11 organa i fecesa 65 serološki pozitivnih životinja i 10 serološki negativnih životinja (kontrolna skupina). Uzorci krvi pretraženi su serološkom, hematološkom i molekularnom pretragom, uzorci 11 organa patoanatomskom i histopatološkom pretragom, uzorci pluća i jetri općom bakteriološkom pretragom te uzorci izmeta parazitološkom pretragom. Hematološkom je pretragom utvrđen stadij trajne infekcije ELG-pozitivnih životinja u trenutku klanja. Patoanatomska i histopatološka pretraga je u ELG-pozitivnih životinja utvrdila

Dr. sc. Dunja VLAHOVIĆ, dr. med. vet., univ. mag. med. vet., viša asistentica, Branka ARTUKOVIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Ivan-CONRADO ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, dr. med. vet., Dipl. ECVF, dr. sc. Lidija MEDVEN ZAGORĐŠAK, dr. med. vet., univ. mag. med. vet., docentica, Doroteja HUBER, dr. med. vet., univ. mag. med. vet., docentica, dr. sc. Andrea GUDAN KURILJ, dr. med. vet., Dipl. ECVF, redovita profesorica, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Branko ŠOŠTARIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, u mirovini, dr. sc. Marko HOHŠTETER, dr. med. vet., redoviti profesor, Bioinstitut d.o.o., Čakovec, dr. sc. Dragon BRNIĆ, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Laboratorij za serološku dijagnostiku virusnih bolesti, Odjel za virologiju, Hrvatski veterinarski institut, sc. Krešimir SEVERIN, dr. med. vet., redoviti profesor, Zavod za sudsko i upravno veterinarstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Valerija BENKO, dr. med. vet., stručna suradnica, Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Lorena JEMERŠIĆ, dr. med. vet., naslovna izvanredna profesorica, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, Laboratorij za dijagnostiku klasične svinjske kuge, molekularnu virologiju i genetiku, Odjel za virologiju, Hrvatski veterinarski institut, dr. sc. Andreja JUNGJIĆ, dr. med. vet., stručna savjetnica, Laboratorij za serološku dijagnostiku virusnih bolesti, Odjel za virologiju, Hrvatski veterinarski institut, dr. sc. Gordan KOMPES, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju, Odjel za bakteriologiju i parazitologiju, Hrvatski veterinarski institut, dr. sc. Relja BECK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Laboratorij za parazitologiju, Odjel za bakteriologiju i parazitologiju, Hrvatski veterinarski institut, dr. sc. Karmen BRANOVIĆ ČAKANIĆ, mag. med. biochem., znanstveni suradnik, Laboratorij za transmisivne spongiformne encefalopatije, Odjel za patološku morfologiju, Hrvatski veterinarski institut, Krunoslav SOKOLIĆ, dr. med. vet., MM Mesna industrija, Krašić. Dopsina autorica: dvlahovic@vef.unizg.hr.

nešto češće promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Molekularnom pretragom PCR u stvarnom vremenu je u krvi 46 od 65 (70,77%) ELG-pozitivnih životinja dokazana provirusna DNA. Nije utvrđena sklonost ovih životinja prema sekundarnim bakterijskim ni parazitskim infekcijama. Statistički znakovito ($p < 0,05$) veće vrijednosti ukupnih leukocita u krvi, stupnja reaktivne hiperplazije slezene i stupnja neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene ukazuju na potencijalnu ulogu neutrofila kao B-pomoćničkih neutrofila u slezeni, što je ujedno prvi takav nalaz opisan u goveda u RH. U prilog ovome govori i viša vrijednost neutrofila u krvi na granici znakovitosti ($p = 0,051$) u ELG-pozitivnih životinja.

Ključne riječi: enzootska leukoza goveda, patologija, histopatologija, PCR u stvarnom vremenu.

Abstract

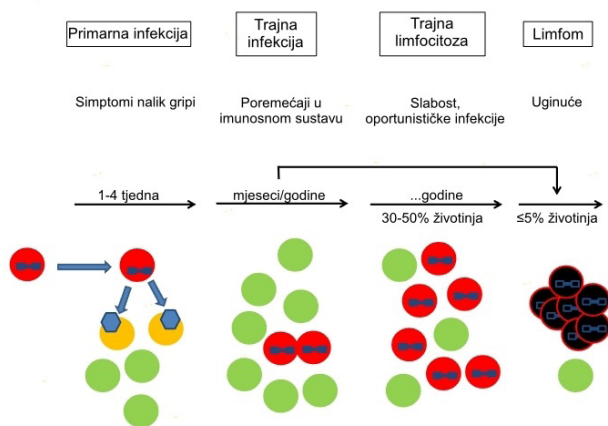
Enzootic bovine leukosis is a chronic viral infectious disease in cattle caused by the bovine leukemia virus (BLV). It has significant economic implications due to losses caused by decreased milk production, increased herd culling rates, reduced lifespan, and increased susceptibility to secondary diseases. The aim of this study was to determine the stage of infection in cows and heifers serologically positive for the BLV virus in the Republic of Croatia, to determine pathological changes in their organs, to detect proviral DNA in the blood, and to determine their susceptibility to secondary bacterial and parasitic infections. From 2015 to 2016, blood samples, 11 organ samples, and feces were collected from 65 serologically positive animals and 10 serologically negative animals (control group). Serological, hematological and molecular examinations were performed of the blood samples. Organ samples were examined grossly and histopathologically. Lung and liver samples were evaluated by bacteriological tests, and feces samples by parasitological tests. Hematological testing showed that the BLV-positive animals were in a state of persistent infection at the time of slaughter. Gross and histopathological findings showed somewhat more frequent changes in BLV-positive animals compared to the control group. Real-time PCR detected proviral DNA in the blood of 46 out of 65 (70.77%) BLV-positive animals. No increased susceptibility to secondary bacterial or parasitic infections was found in these animals. The statistically significant ($p < 0.05$) higher total of white blood cell count in the blood, the degree of reactive splenic hyperplasia, and the degree of neutrophil infiltration in the splenic marginal zone suggest the potential role of neutrophils as B-helper neutrophils in the spleen, which is the first such finding described in cattle in Croatia. The borderline significantly higher value of neutrophils in the blood ($p = 0.051$) in BLV-positive animals also supports this finding.

Key words: enzootic bovine leukosis, pathology, histopathology, real-time PCR

Uvod

Enzootska leukoza goveda (ELG) kronična je zaražna virusna bolest goveda uzrokovana RNA virusom iz porodice Retroviridae, potporodice Orthoretrovirinae, roda Deltaretrovirus. Ovaj virus inficira B-limfocite, a rjeđe i T-limfocite (Panei i sur., 2013.; Valli i sur., 2016.), nakon čega se pomoću enzima reverzne transkriptaze i integraze ugrađuje u genom stanice domaćina u obliku provirusne DNA i tako uzrokuje doživotnu infekciju (Kettmann i sur., 1979.). Infekcija ima četiri stadija: primarna infekcija, trajna infekcija, trajna limfocitoza i limfom (slika 1) (EFSA, 2015.). Do primarne infekcije dolazi prijenosom stanice zaražene provirusom iz zaražene životinje u prijemljivu životinju, a kako je najčešći horizontalni način širenja, i to ijtrogeni, većina se životinja zarazi višekratnom upotrebom injekcijskih igala i rukavica za rektalni pregled (Hopkins i sur., 1991.; Erskine i sur., 2012b.). U manjem broju slučajeva do prijenosa dolazi verti-

kalno ili hematofagnim insektima (Hopkins i Digiacomo, 1997.; Erskine i sur., 2012b.). Ovaj početni stadij infekcije traje između jednog i četiri tjedna, kada se virus umnaža i inficira druge stanice, a životinje pokazuju blage kliničke znakove nalik na gripu (EFSA, 2015.). U stadiju trajne infekcije dolazi do dijeljenja mitozom limfocita koji nose provirusnu DNA čime se povećava udio zaraženih limfocita, ali ne i broj ukupnih limfocita u cirkulaciji. Količina provirusa u perifernoj krvi (broj B-limfocita s integriranim provirusom / ukupni broj B-limfocita) iznosi svega oko 1 %. Iako u ovoj fazi može doći do poremećaja u imunom sustavu (Trainin i sur., 1996.; Kabeya i sur., 2001.; Amills i sur., 2002.), nisu vidljive promjene u ukupnom broju limfocita te oko 70 % zaraženih životinja ostane u ovoj fazi bolesti kao asimptomatski nositelj virusa. Jedini je način otkrivanja infekcije nalaz protutijela na virus ELG-a i/ili virusne nukleinske kiseline. Ovo latentno razdoblje može trajati od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, nakon čega će se



Slika 1. Shematski prikaz stadija bolesti (EFSA, 2015.).
Crveni krugovi – inficirani B-limfociti s ugrađenom provirusnom DNA; žuti krugovi – stanice u tijeku infekcije; zeleni krugovi – neinficirani B-limfociti; crni krugovi – neoplastični B-limfociti inficirani virusom ELG-a.

u otprilike 30 – 50 % zaraženih životinja razviti trajna limfocitoza. Nju obilježava povećani broj ukupnih B-limfocita u perifernoj krvi (iznad 10 000/mm³) i promjena u omjeru B-limfocita i T-limfocita u korist B-limfocita (Orlik i Splitter, 1996.; EFSA, 2015.), što može uzrokovati imunosupresiju i posljedične oportunističke infekcije (Brenner i sur., 1989.; Frie i Coussens, 2014.). Limfom se pojavljuje u manje od 5 % životinja starijih od tri godine (Kramme i sur., 1994.) zbog proliferacije monoklonskih ili oligoklonskih neoplastičnih B-limfocita. Utvrđena je uloga virusnog proteina Tax kao i mutacija tumor-supresorskog gena *p53* u razvoju ovog stadija (Derse, 1987.; Zorić i sur., 2010.). Klinička slika ovisi o zahvaćenom organu i stupnju progresije tumora, a najčešće se pojavljuje limfadenopatija, opća slabost i gubitak težine (Marshak i sur., 1962.; Tawfeeq i sur., 2012.).

Ako se bolest ne suzbija, uzrokuje velike ekonomske gubitke, najčešće zbog pada mliječnosti (Erskine i sur., 2012a.), povećane stope izlučenja iz stada (Pollari i sur., 1993.), kraćeg životnog vijeka zaraženih životinja (Bartlett i sur., 2013.) i povećane podložnosti različitim infekcijama (Frie i Coussens, 2014.; Kosuke i sur., 2016.).

U Republici Hrvatskoj se od 2011. godine provodi Program iskorjenjivanja i nadziranja enzootske leukoze na cjelokupnoj populaciji goveda starijih od 24 mjeseca u svrhu ostvarivanja statusa stada goveda službeno slobodnih od ELG-a (Roić i sur., 2013.).

U ovom su istraživanju prvi put u Republici Hrvatskoj sustavno pretražene krave i junice serološki pozitivne na virus ELG-a koje su upućene na klanje pre-

ma Programu iskorjenjivanja i nadziranja enzootske leukoze goveda. Cilj je ovog istraživanja bio odrediti hematološkom pretragom krvi u kojem su se stadiju infekcije životinje nalazile u trenutku klanja, molekularnom pretragom krvi istražiti prisutnost provirusne DNA u zaraženih životinja, patoanatomskom, histopatološkom i bakteriološkom pretragom obraditi uzorke organa te parazitološkom pretragom uzorke izmeta kako bismo doznali postoje li patološke promjene posredno ili neposredno uzrokovane ovim virusom.

Materijal i metode

Uzorci

Ovo istraživanje je odobreno od Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu (klasa 640-01/15-17/68, ur. broj 251-61-01/139-15-2) od 18. prosinca 2015.

Od 2015. do 2016. godine u četiri klaonice u Republici Hrvatskoj, na području Zagrebačke i Virovitičko-podravске županije, prikupljani su uzorci od 65 serološki pozitivnih životinja na virus ELG-a. Serološki pozitivne životinje evidentirane su tijekom provedbe godišnjeg Programa iskorjenjivanja ELG-a u Republici Hrvatskoj (Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Ministarstvo poljoprivrede). Serološka je pretraga provedena u Laboratoriju za serološku dijagnostiku virusnih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu (HVI), primjenom akreditiranih metoda, i to probirnog (IDEXX Leukosis Serum Screening Ab Test, IDEXX Laboratories, SAD) i potvrdnog (IDEXX Leukosis Blocking Ab Test, IDEXX Laboratories, SAD) imunoenzimnog testa za dokazivanje protutijela za virus ELG-a. Metode su primijenjene prema uputama proizvođača. Kao negativne kontrole upotrijebljeni su uzorci od 10 nasumično odabranih serološki negativnih krava s linije klanja. Od 65 serološki pozitivnih životinja, 58 su bile krave, a 7 junice. Najčešća je pasmina bila holštajnsko-frizijsko govedo ($n = 35$; 53,85 %), zatim simentalско govedo ($n = 29$; 44,61 %) te simentalско-holštajnsko govedo ($n = 1$; 1,54 %). Raspon dobi iznosio je od 2 do 15 godina, najčešća je dob bila 8 godina, a prosječna 6 godina. Serološki negativne životinje također su najčešće bile holštajnsko-frizijske pasmine ($n = 8$; 80 %), a dvije životinje simentalске pasmine (20 %). Raspon dobi iznosio je od 3 do 12 godina, najčešća je dob bila podjednako 3 i 4 godine, a prosječna 6,3 godine. Prema podacima o svim zabilježenim rezultatima seroloških testiranja na ELG dobivenima od Hrvatske poljoprivredne agencije, definirano je najdulje moguće trajanje in-

fekcije kao razdoblje između posljednjeg pozitivnog rezultata i prethodnog negativnog rezultata serološke pretrage. Dobivenom je periodu pribrojen i period od datuma posljednjeg pozitivnog rezultata do datuma klanja. Ovi su podaci bili dostupni za 33 od 65 životinja, za koje je utvrđeno da je u trenutku klanja u 18 životinja infekcija mogla trajati najdulje 7 mjeseci, u 11 životinja 5 mjeseci, u 3 životinje 2,6 godina te u 1 životinje 2,7 godina. Od životinja su prilikom klanja uzorkovani puna krv, organi i izmet.

Hematološka pretraga

Hematološka je pretraga provedena u Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na 63 uzorka krvi serološki pozitivnih životinja i 10 uzoraka krvi iz kontrolne skupine. Dva su uzorka krvi serološki pozitivnih životinja bila neprikladna za pretragu. Ukupan je broj leukocita određen pomoću hematološkog brojača (Horiba ABX, Micros, Francuska) s postavkama za goveda. Za određivanje diferencijalne krvne slike načinjeni su krvni razmazi, obojeni prema May-Grünwald-Giemsi te pregledani pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41 (Japan). Postotak limfocita, neutrofila i eozinofila određen je na sto leukocita u jednom ili više vidnih polja pod povećanjem 100 puta. Zbog nedostatka podataka iz literature o referentnim vrijednostima holštajnsko-frizijskog i simentalskoga goveda na području Republike Hrvatske, referentne su vrijednosti određene prema radu Roland i suradnika (2014.), koji obuhvaća tri različita izvora određivanja hematoloških pokazatelja goveda u Kanadi, Njemačkoj i Kaliforniji.

Makroskopski pregled organa i histopatološka pretraga

Na liniji klanja organi su pregledani na prisutnost patoloških promjena. Izuzeti su uzorci pluća, traheo-bronhalnih limfnih čvorova, jetre, slezene, bubrega, buraga, sirišta, tankog crijeva, mezenterijalnih limfnih čvorova, maternice i jajnika te su fiksirani u 10 %-tnom neutralnom formalinu. U Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu provedena je rutinska metoda bojenja hematoksilin-eozinom (HE). Za histopatološku analizu i fotografiranje upotrijebljen je svjetlosni mikroskop Nikon Eclipse E600 s kamerom Olympus DP20.

Molekularna pretraga

Molekularna je pretraga provedena u Laboratoriju za dijagnostiku klasične svinjske kuge, moleku-

larnu virologiju i genetiku (HVI, Zagreb). Za izdvajanje provirusne DNA iz pune krvi korišten je komplet iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit (Invitrogen, Carlsbad, SAD) i uređaj za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen, Carlsbad, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon izdvajanja provirusne DNA iz pune krvi proveden je PCR u stvarnom vremenu pomoću uređaja Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Njemačka). Upotrijebljen je komercijalno dostupan komplet QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) te početnice BLV-pol-as, BLV-pol-s i probu BLV-pol-proba sintetizirane u tvrtki Bio Basic Inc. (Ontario, Kanada) prema prilagođenom protokolu (Heenemann i sur., 2012.). Originalni je protokol izmijenjen prema uputama proizvođača navedenog kompleta, a izmjene su uspješno provjerene na uzorcima međulaboratorijskog ispitivanja u navedenom laboratoriju.

Opća bakteriološka i parazitološka pretraga

Opća bakteriološka pretraga provedena je u Laboratoriju za opću bakteriologiju i mikologiju (HVI, Zagreb) na plućima i jetrama 65 serološki pozitivnih životinja i 10 životinja iz kontrolne skupine. Nakon sterilnog uzorkovanja organa materijal je nacijepljen na tri hranjive podloge (eskulin krvni agar, neutralni agar i XLD agar) te inkubiran u aerobnim uvjetima 72 sata pri 37° C. Ukoliko je došlo do porasta bakterijskih kolonija učinjeno je precijepljivanje bakterijske kolonije radi dobivanja čiste bakterijske kulture. Zatim je provedena primarna identifikacija procjenom oblika i veličine kolonije, KOH testom je određeno da li je bakterijska kultura Gram-pozitivna ili Gram-negativna te su provedeni katalaza i oksidaza testovi. Temeljem dobivenih rezultata određena je porodica kojoj pripada izdvojeni bakterijski soj, a završna identifikacija bakterija provedena je BBL Crystal biokemijskim sustavom.

Parazitološka je pretraga provedena u Laboratoriju za parazitologiju (HVI, Zagreb). Uzorci izmeta pretraženi su metodama sedimentacije i flotacije radi dokazivanja razvojnih stadija parazita (jajašca, ličinke, ciste, oociste) te neposrednom imunofluorescencijom za dokazivanje oocista iz roda *Cryptosporidium* i cisti bičaća *Giardia duodenalis*.

Statistička obrada

Analiza kvantitativnih varijabli provedena je metodama opisne statistike. Nakon određivanja normalnosti raspodjele metričkih varijabli primijenjeni su odgovarajući parametrijski, odnosno neparamet-

trijski testovi. Znakovitost razlika između podataka nezavisnih skupina, koje su slijedile normalnu raspodjelu, testirana je Studentovim t-testom, a za skupine koje nisu slijedile normalnu raspodjelu primijenjen je Mann-Whitneyev U-test, odnosno Kruskal-Wallisov test. Korelacija između odabranih pokazatelja utvrđena je pomoću Pearsonova koeficijenta korelacije. Statističke su hipoteze testirane na razini znakovitosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$. Statistička analiza svih navedenih pokazatelja provedena je primjenom programa STATISTICA 12 (StatSoft, USA).

Rezultati

Rezultati hematološke pretrage

U četiri serološki pozitivne životinje utvrđen je veći ukupni broj leukocita u odnosu na referentne vrijednosti, dok su se vrijednosti limfocita, neutrofila i eozinofila nalazile unutar referentnih vrijednosti. U kontrolnoj skupini nije bilo odstupanja krvnih parametara od referentnih vrijednosti. Utvrđena je statistički znakovita ($p < 0,01$) veća vrijednost ukupnih leukocita u krvi serološki pozitivnih ($7,51 \times 10^9/L$) u odnosu na negativne životinje ($4,47 \times 10^9/L$). U pozitivnih životinja utvrđen je veći postotak neutrofila u krvi u odnosu na negativne (61,06 % i 50,6 %), na samoj granici značajnosti ($p = 0,051$). Nije utvrđena statistički znakovita razlika u postotku limfocita i eozinofila između pozitivnih (32,94 %; 3,27 %) i negativnih (42,6 %; 3,9 %) životinja.

Rezultati makroskopskog pregleda organa i histopatološke pretrage

U 13 od 65 serološki pozitivnih životinja uočene su patomorfološke promjene. Najčešće je to bilo povećanje traheobronhalnih limfnih čvorova. Ostale su promjene bile pojedinačne, a uključivale su povećanje mezenterijalnih limfnih čvorova, atelektaze i emfizem pluća, nodularne tvorbe na plućima, tvorbe na jetri, bjelkasta područja na bubrezima, subepikardijalna i potkožna krvarenja. U organima životinja kontrolne skupine nisu uočene makroskopske patološke promjene. Histopatološkom pretragom organa u većine serološki pozitivnih životinja uočene su sljedeće promjene: sarkocistoza miokarda (98,46 %), reaktivna hiperplazija slezene (87,31 %), prisutnost neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene (80,96 %) (slika 3), limfoplazmatični infiltrat u intersticiju bubrega (78,46 %) (slika 2.B), reaktivna hiperplazija traheobronhalnih limfnih čvorova (75 %), reaktivna hiperplazija mezenterijalnih limfnih čvorova (68,75 %), intersticijska pneumonija (68,75 %), limfoplazmatični infiltrat u jetri (66,15 %) (slika 2.C)

i mješoviti infiltrat u sluznici tankog crijeva (64,62 %). Navedene su promjene najčešće bile blagog stupnja, osim hiperplazije slezene koja je najčešće bila srednjeg stupnja i neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene koji je bio najčešće jakog stupnja (slika 3.C). U miokardu 58,46 % životinja, osim sarkocistoze, uočen je i blagi mješoviti, dominantno limfoplazmatični infiltrat (slika 2.A).

U buragu, sirištu, maternici i jajniku većine životinja nisu uočene promjene, a u malom su broju slučajeva uočene vrlo blage promjene, poput malog broja pustula u epitelu papila buraga, blagog limfoplazmatičnog infiltrata u sluznici sirišta (slika 2.D), edema endometrija i atrofije kore i cistične degeneracije jajnika. U serološki negativnih životinja najčešće je uočena intersticijska pneumonija (80 %), limfoplazmatični infiltrat u intersticiju bubrega (70 %), limfoplazmatični infiltrat u sluznici sirišta (70 %), prisutnost neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene (70 %), limfoplazmatični infiltrat u jetri (50 %), reaktivna hiperplazija slezene (50 %) i reaktivna hiperplazija mezenterijalnog limfnog čvora (50 %). Sve su navedene promjene većinom bile blagog stupnja. Druge promjene, poput sarkocistoze miokarda, hiperplazije traheobronhalnog limfnog čvora, infiltrata u sluznici crijeva i pustula u epitelu buraga, pojavljivale su se u malom broju životinja. U maternici i jajniku nisu uočene promjene.

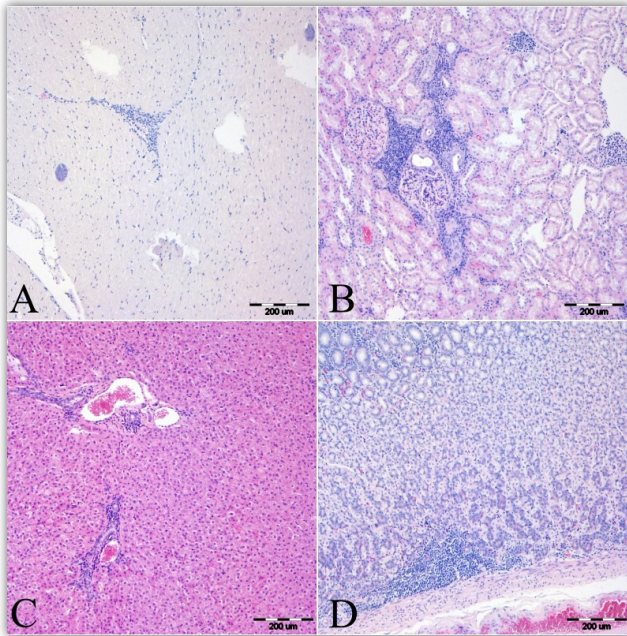
Utvrđene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u stupnju reaktivne hiperplazije slezene te u stupnju neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene između serološki pozitivnih i serološki negativnih životinja.

Rezultati molekularne pretrage

Primjenom PCR-a u stvarnom vremenu u krvi 46 od 65 (70,77 %) serološki pozitivnih životinja na ELG dokazana je provirusna DNA virusa ELG-a. U krvi životinja serološki negativnih na ELG nije otkrivena provirusna DNA.

Rezultati opće bakteriološke i parazitološke pretrage

Općom bakteriološkom pretragom iz dostavljenih uzoraka pluća i jetri dviju serološki pozitivnih životinja izdvojen je beta-hemolitički streptokok. Opća bakteriološka pretraga dostavljenih uzoraka pluća i jetri ostalih životinja dala je negativni rezultat. U izmetu serološki pozitivnih životinja pronađena su jaja strongilidnog tipa (32,81 %), oociste iz roda *Eimeria* (10,94 %), ciste bičaja *Giardia duodenalis* (4,69 %) i ciste bičaja *Buxtonella sulcata* (4,69 %). U izme-

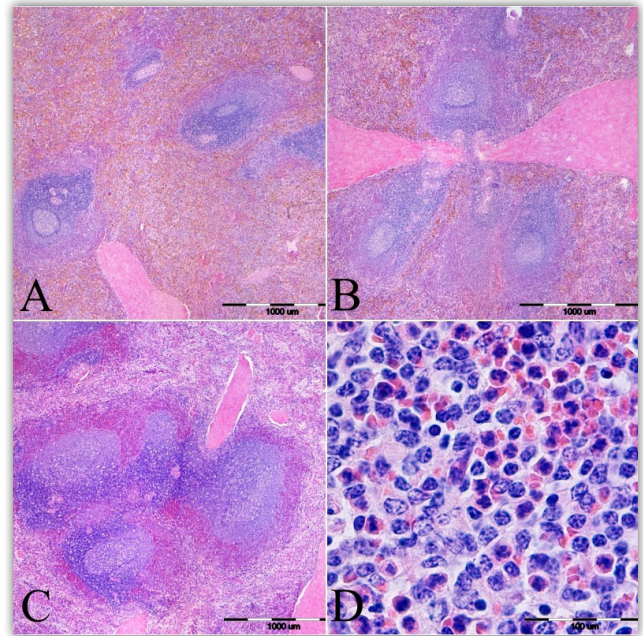


Slika 2. Limfoplazmacitni infiltrat slabijeg stupnja u organima seropozitivnih životinja. A. Miokard, HE 10 x 10. B. Buxtonella, HE 10 x 10. C. Jetra, HE 10 x 10. D. Sirište, HE 10 x 10.

tu serološki negativnih životinja pronađena su jaja strongilidnog tipa (20 %) i ciste *Buxtonella sulcata* (10 %). Broj jajašaca i razvojnih stadija parazita u izmetu svih životinja bio je manji od 10 (jaja, oociste, ciste) u gramu izmeta.

Rasprava i zaključci

Jedna je od glavnih značajki virusa enzootske leukoze goveda uzrokovanje doživotne infekcije i relativno dugog latentnog perioda tijekom kojega ona različitim mehanizmima može nepovoljno djelovati na imunosno stanje zaraženih životinja i time oslabiti njihovu otpornost prema različitim oportunističkim infekcijama. Budući da su za dio životinja (50,8 %) bili dostupni podaci o prethodnim serološkim testiranjima, na osnovi njih utvrdili smo da su te životinje u trenutku klanja mogle biti inficirane najdulje 5 mjeseci do 2 godine i 7 mjeseci, što odgovara stadiju trajne infekcije. U prilog ovomu govore i rezultati hematološke pretrage kojima nije utvrđeno odstupanje postotka limfocita od referentnih vrijednosti. Statistički znakovito veće vrijednosti ukupnih leukocita u krvi, jačeg stupnja reaktivne hiperplazije slezene te neutrofilnog infiltrata u marginalnoj zoni slezene, kao i veća vrijednost neutrofila u krvi, na samoj granici značajnosti, serološki pozitivnih životinja u odnosu na negativne mogu upućivati na ulogu neutrofila u imunosnom sustavu i njihovo međudjelovanje s B-limfocitima marginalne zone (Puga i sur., 2011.). U



Slika 3. Neutrofilni infiltrat u marginalnoj zoni slezene seropozitivnih životinja. A. Slabi stupanj, HE 4 x 10. B. Srednji stupanj, HE 4 x 10. C. Jaki stupanj, HE 4 x 10. D. Brojni neutrofilni u marginalnoj zoni, HE 40 x 10.

tom su radu neutrofilni koji se nalaze u marginalnoj zoni slezene nazvani B-pomoćničkim neutrofilima jer potiču B-limfocite na proizvodnju protutijela i produžuju im životni vijek. Jedan je od ciljeva bio i vrednovanje metode PCR u stvarnom vremenu za dokazivanje provirusne DNA u krvi serološki pozitivnih životinja. Prema radovima Heenemann i suradnika (2012.) i Rola-Łuszczak i suradnika (2013.), PCR u stvarnom vremenu brza je, vrlo specifična i osjetljiva metoda za dokazivanje dijela gena *pol* u genomu virusa ELG-a iz mononuklearnih stanica periferne cirkulacije. U EFSA-inu znanstvenom mišljenju (EFSA, 2015.) također se navodi upotreba PCR-a u stvarnom vremenu prema protokolu opisanom u radu od Heenemann i suradnika (2012.) za otkrivanje provirusa u ranim stadijima infekcije te u slučajevima nejasnih rezultata ELISA-e. Za razliku od rezultata u navedenom radu, koji su se u potpunosti podudarali s rezultatima serološke pretrage, u ovom je istraživanju provirusna DNA utvrđena u 70,77 % krvi životinja serološki pozitivnih na virus ELG-a. Razlog tomu mogao bi biti izdvajanje provirusne DNA iz pune krvi umjesto iz mononuklearnih stanica periferne cirkulacije, preniska koncentracija provirusne DNA i/ili genotipska raznolikost sojeva virusa ELG-a. Slični rezultati, koji upućuju na manju osjetljivost molekularnih u odnosu na serološke metode, primijećeni su kod primjerice lentivirusa malih preživača, također pripadnika porodice Retroviridae (Michiels i sur., 2018.). S obzirom

na podatke iz literature koji upućuju na poremećaje imunosnog odgovora u goveda inficiranih virusom enzootske leukoze goveda (Frie i Coussens, 2014.), provedena je opća bakteriološka pretraga pluća i jetara serološki pozitivnih i negativnih životinja kako bi se utvrdilo jesu li životinje inficirane virusom ELG-a podložnije sekundarnim bakterijskim infekcijama od životinja u kontrolnoj skupini. Zbog nepostojanja pratećih makroskopskih i histopatoloških lezija u plućima i jetri, iz kojih je izoliran beta-hemolitički streptokok, najvjerojatnije se radilo o slučajnom nalazu, te se može zaključiti da u serološki pozitivnih životinja nisu ustanovljene sekundarne bakterijske infekcije. Parazitološka pretraga izmeta rezultirala je negativnim nalazom u većine životinja iz obje skupine, a kod manjeg broja životinja pronađen je vrlo mali broj (< 10/gram izmeta) razvojnih oblika parazita. U skladu s parazitološkim nalazom jesu i makroskopski pregled trupa životinja i organa kojim je utvrđeno dobro gojno stanje svih životinja, a tekući sadržaj u debelom crijevu zabilježen je u samo jedne životinje te histopatološka pretraga buraga, sirišta i tankog crijeva kojom nisu pronađeni paraziti ni njihovi razvojni stadiji. Iz ovog proizlazi zaključak da životinje inficirane virusom ELG-a, barem u ranom stadiju infekcije, nisu podložnije sekundarnoj parazitskoj invaziji u odnosu na neinficirane jedinke.

Zaključno, ovim je istraživanjem utvrđeno da su se serološki pozitivne životinje na ELG u RH u trenutku klanja nalazile u aleukemijskom stadiju bolesti, tj. stadiju trajne infekcije u kojem je došlo do serokonverzije, ali ne i do trajne limfocitoze. U ovom stadiju bolesti još nije došlo do razvoja znatnih patoloških promjena niti sekundarnih bakterijskih i parazitskih infekcija. Izraženi neutrofilni infiltrat u marginalnoj zoni slezene, zajedno s jačom reaktivnom hiperplazijom slezene, nov je i zanimljiv nalaz koji još nije opisan u goveda u RH, a prema podacima iz literature (Puga i sur., 2011.) može upućivati na ulogu neutrofila kao B-pomoćničkih neutrofila koji u marginalnoj zoni slezene potiču B-limfocite na pojačanu proizvodnju protutijela na antigen, u ovom slučaju najvjerojatnije na virus ELG-a.

Literatura

- AMILLS, M., V. RAMIYA, J. NORIMINE, C. A. OLMSTEAD, H. A. LEWIN (2002): Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. *Virology* 304, 1-9. doi: 10.1006/viro.2002.1651.
- BARTLETT, P. C., B. NORBY, T.M. BYREM, A. PARMELEE, J. T. LEDERGERBER, R. J. ERSKINE (2013): Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 96, 1591-1597. doi: 10.3168/jds.2012-5930.
- BRENNER, J., M. VAN-HAAM, D. SAVIR, Z. TRAININ (1989): The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 299-305. doi: 10.1016/0165-2427(89)90017-2.
- DERSE, D. (1987): Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J. Virol.* 61, 2462-2471. doi: 10.1128/JVI.61.8.2462-2471.1987.
- EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (EFSA AHAW PANEL) (2015): Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal* 13. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4188.
- ERSKINE, R. J., P. C. BARTLETT, T. M. BYREM, C. L. RENDER, C. FEBVAY, J. T. HOUSEMAN (2012a): Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J. Dairy Res.* 79, 445-450. doi: 10.1017/S0022029912000520.
- ERSKINE, R.J., P.C. BARTLETT, T.M. BYREM, C.L. RENDER, C. FEBVAY, J. T. HOUSEMAN (2012b): Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95, 727-734. doi: 10.3168/jds.2011-4760.
- FRIE, M. C., P. M. COUSSENS (2014): Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163, 103-114. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
- HEENEMANN, K., S. LAPP, J. P. TEIFKE, D. FICHTNER, T. C. METTENLEITER, T. W. VAHLENKAMP (2012): Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 649-655. doi: 10.1177/1040638712447524.
- HOPKINS, S. G., R. F. DIGIACOMO, J. F. EVERMANN, J. D. CHRISTENSEN, D. P. DEITELHOFF, W. D. MICKELSEN (1991): Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1035-1038.
- HOPKINS, S., R. F. DIGIACOMO (1997): Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13, 107-128. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30367-4.
- KABEYA, H., K. OHASHI, M. ONUMA (2001): Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 703-708. doi: 10.1292/jvms.63.703.

- KETTMANN, R., M. MEUNIER-ROTIVAL, J. CORTADAS, G. CUNY, J. GHYSDAEL, M. MAMMERICKX, A. BURNY, G. BERNARDI (1979): Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4822-4826. doi: 10.1073/pnas.76.10.4822.
- KOSUKE, O., A. NAKAHARA, S. KONNAI, T. OKAGAWA, A. NISHIMORI, N. MAEKAWA, R. IKEBUCHI, J. KOHARA, S. MURATA, K. OHASHI (2016): Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. *Immun. Inflamm. Dis.* 4, 52-63. doi: 10.1002/iid3.93.
- KRAMME, P. M., C. B. THOMAS, D. SCHULTZ (1994): The Contribution of Bovine Leukaemia Virus Infected B-cells to the Number of Circulating B-cells in Cattle. *Comp. Haematol. Int.* 4, 96-101. doi: 10.1007/BF00368275.
- MARSHAK, R. R., L. L. CORIELL, W. C. LAWRENCE, J. E. CROSHAW, JR., H. F. SCHRYVER, K. P. ALTERA, W. W. NICHOLS (1962): Studies on bovine lymphosarcoma I. Clinical aspects, pathological alterations, and herd studies. *Cancer Res.* 22, 202-217.
- MICHIELS, R., E. VAN MAEL, C. QUINET, N. R. ADJADJ, A. B. CAY, N. DE REGGE (2018): Comparative analysis of different serological and molecular tests for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in Belgian sheep and goats. *Viruses* 10, 696. doi: 10.3390/v10120696.
- ORLIK, O., G. A. SPLITTER (1996): Progression to persistent lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4⁺ T cells in response to *gag*- and *env*- encoded BLV proteins. *J. Virol.* 70, 7584-7593. doi: 10.1128/JVI.70.11.7584-7593.1996.
- PANEI, C. J., S. N. TAKESHIMA, T. OMORI, T. NUNOYA, W. C. DAVIS, H. ISHIZAKI, K. MATOBA, Y. AIDA (2013): Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet. Res.* 9. doi: 10.1186/1746-6148-9-95.
- POLLARI, F. L., R. F. DIGIACOMO, J. F. EVERMANN (1993): Use of survival analysis to compare cull rates between bovine leukemia virus seropositive and seronegative dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1400-1403.
- PUGA, I., M. COLS, C. M. BARRA, B. HE, L. CASSIS, M. GENTILE, L. COMERMA, A. CHORNY, M. SHAN, W. XU, G. MAGRI, D. M. KNOWLES, W. TAM, A. CHIU, J. B. BUSSEL, S. SERRANO, J. A. LORENTE, B. BELLOSILLO, J. LLORETA, N. JUANPERE, F. ALAMEDA, T. BARÓ, C. D. DE HEREDIA, N. TORÁN, A. CATALÀ, M. TORREBADELL, C. FORTUNY, V. CUSÍ, C. CARRE-RAS, G. A. DIAZ, J. M. BLANDER, C. M. FARBER, G. SILVESTRI, C. CUNNINGHAM-RUNDLES, M. CALVILLO, C. DUFOUR, L. D. NOTARANGELO, V. LOUGARIS, A. PLEBANI, J. L. CASANOVA, S. C. GANAL, A. DIEFENBACH, J. I. ARÓSTEGUI, M. JUAN, J. YAGÜE, N. MAHLAOU, J. DONADIEU, K. CHEN, A. CERUTTI (2011): B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170-180. doi: 10.1038/ni.2194.
- ROIĆ, B., T. KIŠ, A. JUNGIĆ, B. BAČANEK, M. LOLIĆ, A. TOMAC, D. LUKAČEVIĆ (2013): Provedba nacionalnog programa iskorjenjivanja enzootske leukoze (ELG) u Republici Hrvatskoj u 2011. godini. *Vet. Stanica* 44, 83-92.
- ROLA-ŁUSZCZAK, M., C. FINNEGAN, M. OLECH, B. CHOUDHURY, J. KUŹMAK (2013): Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J. Virol. Methods* 189, 258-264. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.02.014.
- ROLAND, L., M. DRILLICH, M. IWERSEN (2014): Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 592-598. doi: 10.1177/1040638714546490.
- TAWFEEQ, M. M., M. TAGAWA, Y. ITOH, K. SUGIMOTO, Y. KOBAYASHI, H. INOKUMA (2012): Overexpression of interleukin 2 receptor, thymidine kinase and immunoglobulin-associated alpha-1 messenger RNA in a clinical case of enzootic bovine leukosis. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1203-1206. doi: 10.1292/jvms.12-0100.
- TRAININ, Z., J. BRENNER, R. MEIROM, H. UNGARWARON (1996): Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 293-302. doi: 10.1016/s0165-2427(96)05706-6.
- VALLI, V. E. O., M. KIUPEL, D. BIENZLE, R. D. WOOD (2016): Hematopoietic System. U: Maxie, M. G.: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Elsevier, St. Louis, (102-268).
- ZORIĆ, A., A. HORVAT, N. SLADE (2010): Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina Flum.* 46, 135-143.